

УДК 577.3:621.384.8:547.495.9

МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ОЛІГОМЕРНОГО СКЛАДУ ПОЛІГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНІДИНУ

А. В. Лисиця¹
А. В. Ребрієв²
В. В. Поліщук¹

¹Інститут сільського господарства Західного Полісся
НААН України, Рівне
²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: lysyca@ukr.net, rebriev@ukr.net

Отримано 26.07.2012

Наведено результати мас-спектрометричних досліджень олігомерного складу солей полігексаметиленгуанідину. Зазвичай полімерні похідні гуанідину використовують як дезінфектанти, проте в деяких випадках вони здатні підсилювати проліферативну активність клітин, можуть використовуватись у біотехнології для регуляції росту мікроорганізмів, а також стимулювати проростання насіння сільськогосподарських культур. Визначено будову чотирьох типів олігомерів полігексаметиленгуанідину лінійної структури, що відрізняються складом кінцевих груп. Ідентифікація за допомогою методу мас-спектрометрії складу і будови різних зразків полігексаметиленгуанідину дасть змогу краще зрозуміти механізми їхньої біологічної активності. У дослідженнях використано такі варіанти методу мас-спектрометрії, як MALDI-TOF-MS і TOF-PDMS. Встановлено, що аніонний склад солей полігексаметиленгуанідину має суттєве значення за іонізації в PDMS і неістотно впливає на якість мас-спектрів, отриманих методом MALDI.

Ключові слова: полігексаметиленгуанідин, олігомери, метод мас-спектрометрії.

Полімерні похідні гуанідину зазвичай використовують як дезінфектанти. Одним із типових представників цієї групи є полігексаметиленгуанідин (ПГМГ) (рис. 1). Біологічна активність ПГМГ зумовлена наявністю гуанідинових груп. Препарати ПГМГ ефективні щодо вегетативних форм бактерій, багатьох видів грибків та вірусів [1]. Завдяки полімерній природі похідні гуанідину менш токсичні і водночас мають вищу антимікробну активність порівняно з їх низькомолекулярними аналогами на зразок хлоргексидину.

Молекула ПГМГ може мати лінійну, розгалужену або частково замкнену форми [1]. Наприклад, методом часопротітної мас-спектрометрії з іонізацією електророзпилювання (*electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry, ESI-TOF MS*) було встановлено структуру 3 типів молекулярних

структур олігомерів ПГМГ лінійної будови [2] і ще 4 типів замкненої або розгалуженої [3]. Зазвичай маса молекул полімеру лежить у межах від кількох сотень до кількох тисяч а.о.м. і залежить від технології синтезу. Олігомерний склад препарату і будова функціональних кінцевих груп молекул полімеру можуть суттєво впливати на його біоцидну активність. Часто неоднорідність за масою, розмірами та формою молекул забезпечує синергізм протимікробної дії. Наприклад, низькомолекулярні складові полімеру легше долають ліпополісахаридний бар'єр клітинної стінки бактерії та руйнують її цитоплазматичну мембрану [4].

Крім того, відомо, що в багатьох випадках низькі концентрації полімерних похідних гуанідину здатні підсилювати проліферативну активність клітин, можуть використовуватись у біотехнології для регуляції росту мікроорганізмів, а також стимулювати проростання насіння сільськогосподарських культур [5]. Загалом слід зазначити, що біофізичні механізми дії ПГМГ на мембрани про- та еукаріотів на сьогодні вивчено недостатньо [6].

Метою досліджень було визначити за допомогою методу мас-спектрометрії (МС) будову і олігомерний склад кількох синтезованих нами солей ПГМГ, які застосовують

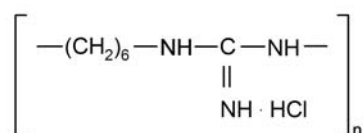


Рис. 1. Структура молекули гідрохлориду полігексаметиленгуанідину (маса мономера \approx 141 а.о.м.)

під час виготовлення дезінфектантів і сти- муляторів проростання насіння.

Для цього використовували такі методи, як часопролітна плазмово-десорбційна мас- спектрометрія (time-of-flight plasma desorp- tion mass spektrometry, TOF-PDMS) [7, 8] і мас-спектрометрія, яка базується на мат- рично-активованій лазерній десорбції/іоні- зації з часопролітним аналізатором (matrix- assisted laser desorbition/ ionisation time-of-flight mass spectrometry, MALDI- TOF MS) [9]. Обидва методи відзначаються порівняно м'яким типом іонізації і дозво- ляють отримувати на мас-спектрах чіткі піки молекулярних іонів або протонованих молекул. Відомо, що MALDI може засто- совуватись для характеристики молекулярно- масового розподілу олігомерів (полістиролу, поліметилакрилату, поліетиленгліколу та ін.), для вивчення різних механізмів ініцію- вання і обриву ланцюга у процесі синтезу полімерів, для визначення функціональних кінцевих груп у полімері тощо [10]. За допо- могою методу PDMS можна ідентифікувати біологічно активні сполуки різних класів та визначати їхню будову [11,12].

Матеріали і методи

Дослідження проводили на мас-спектро- метрі біохімічному МСБХ-01 з іонізацією зразка уламками ділення ядер ²⁵²Cf (ВАТ «SELMІ», Суми, Україна). Під час підготов- ки нітроцелюлозної матриці використовували спеціальний пристрій електронапилення зразків УНП-2 (ВАТ «SELMІ», Суми, Ук- раїна). Підготовку зразків до мас-спектро- метричних досліджень і самі експерименти здійснювали згідно з методиками для PDMS [12–14]. Використовували прискорювальні напруги МСБХ-01 від +10 кВ до –10 кВ. При цьому реєстрували переважно мас-спектри позитивних іонів, які є більш інформатив- ними. Об'єм накопичуваних даних процесу розпаду ²⁵²Cf (стартів) становив від 5 000 до 15 000, ширина каналу детектування — 1 нс/канал. Оброблення спектрів виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми керування, накопичення та обчис- лення даних (МСБХ, версія 4.0/m). На масспектрах по вісі абсцис позначено m/z, тобто відношення маси іона (m) до його заря- ду (z), ординат — відносна інтенсивність піків, яка пропорційна кількості накопиче- них іонів.

Дослідження методом MALDI-TOF про- водили на спектрометрі Voyager DE PRO (Applied Biosystems, США). Застосовували

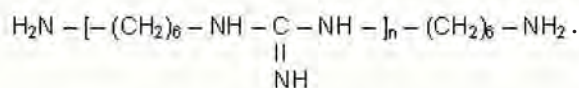
H⁺-матричну іонізацію поліалкіленгуаніди- ну за допомогою 2,5-дигідроксibenзойної кислоти (DHB, Fluka, Швейцарія) під дією лазерного опромінення. Концентрація DHB у матричному реагенті становила 1 мг/мл, реактив розводили у розчині, що складався з однакових об'ємів метанолу (Sigma-Aldrich, США) та води. Співвідношення матричного реагенту до досліджувального зразка 1:1 (за об'ємом). Застосовували рефлекторний режим роботи часопролітного детектора мас-спектрометра з прикладеною напругою 20 кВ. Отримані спектри обробляли за допо- могою програми Data Explorer 4.0 (Applied Biosystems, США). Вимірювали моноізотоп- ні значення протонованих молекул, для усе- реднення використовували дані від 4 до 10 мас-спектрів.

Солі ПГМГ було синтезовано поліконден- сацією гексаметилендіаміну і гуанідину. Зразки розчиняли в суміші вода–етанол (1:1), для аналізу зазвичай послуговувалися розчинами 1% -ї концентрації.

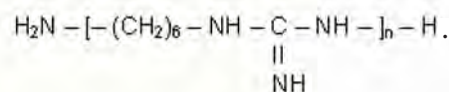
Результати та обговорення

Встановлено, що характери мас-спектрів MALDI для солей ПГМГ різного аніонного складу суттєво не відрізняються. На рис. 2, 3 наведено мас-спектри ПГМГ хлориду і ПГМГ сукцинату, відповідно. Найкраще видно іонізацію молекул в діапазоні мас від 500 до 1000 а.о.м. На мас-спектрах чітко простежуються послідовності піків іонів з різницею $\Delta m/z = 141$, що відповідає масі одного мономера (рис. 1).

Наприклад, для ПГМГ хлориду (рис. 2) це така послідовність піків (серія I): m/z 541, m/z 682, m/z 823 і m/z 964. Аналіз молекулярної будови ПГМГ показує, що ця серія піків протонованих молекул [M+H]⁺ відповідає олігомерам такої будови (n = 3, 4, 5, 6):



Аналіз серії II (піки m/z 583, m/z 724 і m/z 865) дає підстави стверджувати, що це такі протоновані молекули (n = 4, 5, 6):



Аналогічні серії піків іонів наявні також на мас-спектрах солей ПГМГ з янтарною (рис. 3) кислотою.

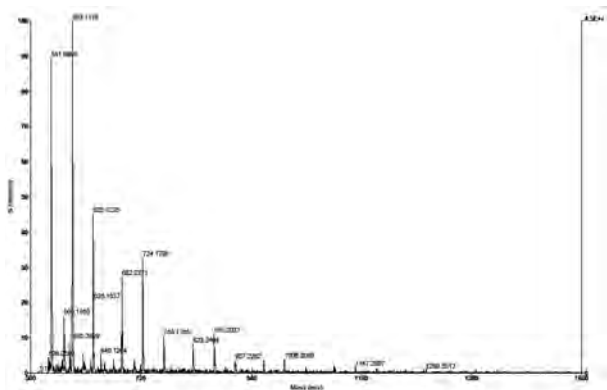
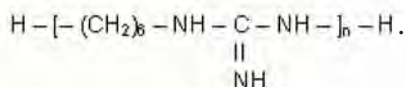
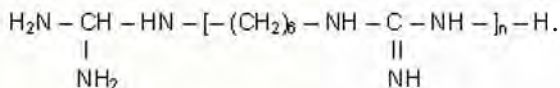


Рис. 2. Хлорид полігексаметиленгуанідину 1%, мас-спектр MALDI

Менш помітними для ПГМГ хлориду є серія III (m/z 566 і m/z 707) та серія IV (m/z 625 і m/z 766). На мас-спектрах ПГМГ сукцинату це, відповідно, m/z 567 (протонована молекула олігогексаметиленгуанідину, $[M+H]^+$, $\Delta m/z = 1$) і m/z 707 (серія III), та m/z 625, m/z 766 (серія IV). Серія III, на нашу думку, належить таким олігомерам ($n = 4, 5$):



А серія IV точно відповідає протонуваним молекулам $[M+H]^+$ ($n = 4, 5$) такої будови:



Із застосуванням методу PDMS з'ясували, що серед різних випробуваних нами солей ПГМГ найкраще відбувається іонізація ПГМГ малеату. Зразок наносили на матрицю з нітроцелюлози, яку електростатично напилювали на позолочену металеву підкладку. На мас-спектрі (рис. 4) присутні піки протонуваних молекул олігомерів $[M+H]^+$: m/z 301, 442, 583, 724, 865 і 1006 ($n = 2, 3, 4, 5, 6$), аналогічні серії II, яку було визначено методом MALDI.

Щодо інших солей ПГМГ, то отримати достатньо якісні мас-спектри PDMS для них було досить складно. На нашу думку, це пов'язано з присутністю у зразках значної кількості низькомолекулярних сполук і солей лужних металів. Окрім того, малеїнова кислота, на відміну від хлоридної або янтарної, є кращим донором електрону. Подібні сполуки здатні полегшувати процес десорбції в PDMS і збільшувати вихід протонуваних іонів [12].

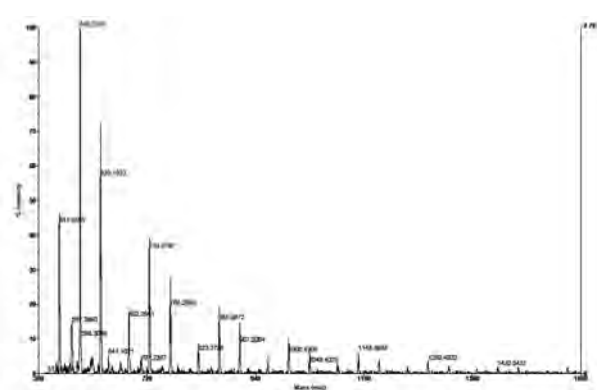


Рис. 3. Сукцинат полігексаметиленгуанідину 1%, мас-спектр MALDI

Таким чином, з'ясували, що як і в разі інших полімерів за допомогою методів MALDI і PDMS на мас-спектрах ПГМГ можна одержати чіткі піки олігомерів. Іони що їх виявлено в діапазоні мас 300–1600 а.о.м., дають змогу ідентифікувати кілька типів олігогексаметиленгуанідинів лінійної форми.

На мас-спектрах, отриманих методом MALDI, за характером кінцевих груп виділено лінійні олігомери ПГМГ 3 типів: одна гуанідинова і одна аміногрупа (тип А), дві аміногрупи (тип В), дві гуанідинові групи (тип С) [2, 3]. Аналогічні групи характерні й для поліоксіалкіленгуанідину [15]. Нами вперше серед олігомерів ПГМГ ідентифіковано компонент амфіфільної будови (серія III). На нашу думку, завдяки цій складовій препарат набуває властивостей поверхнево-активної речовини.

Оскільки різні солі ПГМГ мають різну антибактеріальну активність [1, 16], це може бути пов'язано не лише з відмінностями у формі молекул полімеру (видовжена або глобулоподібна), яка залежить від типу

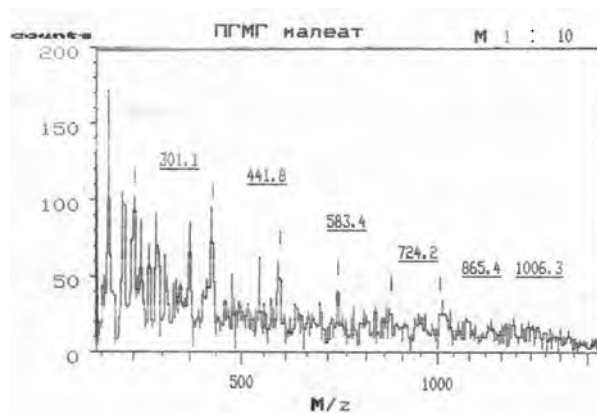


Рис. 4. Малеат полігексаметиленгуанідину 1%, мас-спектр PDMS

аніона, а й із різним олігомерним складом зразків. Вивчення за допомогою мас-спектрометрії, будови і складу різних препаратів ПГМГ уможливить краще розуміння механізмів їхньої мембранно-тропної активності.

Отже, нами вперше отримано мас-спектри TOF-PDMS для ПГМГ, а методом MALDI-TOF MS визначено його олігомерний склад. На мас-спектрах чітко простежується різниця $m/z = 141$, що відповідає масі мономера. З'ясовано, що аніонний компонент різних зразків ПГМГ для методу MALDI не має такого лімітуючого значення, як для

PDMS. Встановлено, що молекулярний склад синтезованих нами зразків полімеру неоднорідний. Визначено декілька типів олігогексаметиленгуанідинів. Олігомери ПГМГ відрізняються не лише за кількістю мономерних ланок, а й за будовою кінцевих груп. Це може суттєво впливати як на антимікробну, так і на ростостимулювальну активність препаратів. Отримані результати дають змогу краще зрозуміти біофізичні механізми дії полімерних похідних гуанідину на мембрани про- та евкаріот, на проліферативну активність клітин мікро- і макроорганізмів.

ЛІТЕРАТУРА

1. *И. И. Воинцева, П. А. Гембицкий.* Полигуанидины — дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционные материалы. — М.: ЛКМ-пресс, 2009. — 304 с.
2. *Albert M., Feiertag P., Hayn G. et al.* Structure Activity Relationships of Oligoguanidines Influence of Counterion, Diamine, and Average Molecular Weight on Biocidal Activities // *Biomacromolecules*. — 2003. — V. 4, № 6. — P. 1811–1817.
3. *Wei D., Ma Q., Guan Y. et al.* Structural characterization and antibacterial activity of oligoguanidine (polyhexamethylene guanidine hydrochloride) // *Mat. Sci. Eng.* — 2009. — V. 29, № 6. — P. 1776–1780.
4. *Gilbert P., Pemberton D., Wilkinson D. E.* Synergism within polyhexamethylene biguanide biocide formulations // *J. Appl. Bacteriol.* — 1990. — V. 69. — P. 593–598.
5. *Лисиця А. В.* Стимулюючі властивості полігексаметиленгуанідину // Тез. докл. научно-практ. конф. «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения», Новый Свет, Крым, Украина, 23–28 мая 2011. — К., 2011. — С. 749, 750.
6. *Лисиця А. В.* Механізми бактерицидної дії полігексаметиленгуанідину // *Наук. доп. Нац. ун-ту біоресурс. природокор. України.* — 2011, № 3 (25). Електр. вид.: http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2011_3/11lav.pdf.
7. *Macfarlane R. D., Torgerson D. F.* 252-Cf-Plasma Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Ph.* — 1976. — V. 21. — P. 81–92.
8. *Сысоев А. А., Артаев В. Б.* Масс-спектрометрия с ионизацией осколками деления ядер калифорния-252 // *Журн. анал. хим.* — 1991. — Т. 46, № 1. — С. 6–18.
9. *Li Liang.* Maldi Mass Spectrometry for Synthetic Polymer Analysis. *Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chem (V. 175).* — John Wiley & Sons, 2009. — 304 p.
10. *Аверко-Антонович И. Ю., Бикмуллин Р.Т.* Методы исследования структуры и свойств полимеров. — Казань: КГТУ, 2002. — 604 с.
11. *Бондаренко П. В., Кныш А. Н., Зубарев Р. А., Розынов Б. В.* Особенности пробоподготовки и анализа белков на новом масс-спектрометре с ионизацией осколками деления калифорния-252 // *Применение масс-спектрометрии в биологии и медицине.* — Харьков: ФТИНТ, 1992. — С. 56–57.
12. *Лисиця А. В.* Фізико-хімічна характеристика біологічно активних речовин за даними часопролітної плазмово-десорбційної мас-спектрометрії: Автореф. дис... канд. біол. наук: 03.00.02 / Київський нац. ун-т імені Тараса Шевченка. — К., 2002. — 19 с.
13. *Деклараційний патент 47720 А Україна, МПК G01N33/50.* Спосіб визначення хімічної сумісності біологічно активних речовин за допомогою мас-спектрометрії / А. В. Лисиця, М. С. Мандигра (UA). — 2001085672; Заявл. 09.08.2001; Опубл. 15.07.2002, Бюл. №7.
14. *Мандигра М. С., Лисиця А. В., Дмитрієв І. М.* Метод мас-спектрометрії як один із підходів до розробки і випробування нових лікувально-профілактичних препаратів // *Наук.-техн. бюл. Інст. біол. твар. ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.* — Львів. — 2005. — Вип. 6, № 3. — С. 259–264.
15. *Feiertag P., Albert M., Ecker-Eckhofen E.-M. et al.* Structural Characterization of Biocidal Oligoguanidines // *Macromol. Rap. Commun.* — 2003. — V. 24, N 9. — P. 567–570.
16. *Мандигра М. С., Лисиця А. В., Степанюк І. В. та ін.* Порівняльна оцінка бактерицидної активності різних похідних гуанідину // *Наук. вісн. Львів. нац. ун-ту вет. мед. біотехнол. ім. С. Гжицького.* — 2009. — Т. 11, № 2 (41). — Ч. 2. — С. 220–226.

**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ
ОЛИГОМЕРНОГО СОСТАВА
ПОЛИГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИНА**

А. В. Лисица¹
А. В. Ребриев²
В. В. Полищук¹

¹Институт сельского хозяйства
Западного Полесья НААН Украины, Ровно
²Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: lysytsya@ukr.net, rebriev@ukr.net

Приведены результаты масс-спектрометрических исследований олигомерного состава солей полигексаметиленгуанидина. Полимерные производные гуанидина используют в качестве дезинфектантов, но в ряде случаев они способны усиливать пролиферативную активность клеток, могут использоваться в биотехнологии для регуляции роста микроорганизмов, а также стимулировать прорастание семян сельскохозяйственных культур. Определено строение четырех типов олигомеров полигексаметиленгуанидина линейной структуры, которые отличаются по составу конечных групп. Идентификация с помощью метода масс-спектрометрии состава и строения различных образцов полигексаметиленгуанидина позволит лучше понять механизмы их биологической активности. В исследованиях использованы такие варианты метода масс-спектрометрии, как MALDI-TOF MS и TOF-PDMS. Установлено, что анионный состав солей полигексаметиленгуанидина имеет существенное значение при ионизации в PDMS и оказывает незначительное влияние на качество масс-спектров, полученных методом MALDI.

Ключевые слова: полигексаметиленгуанидин, олигомеры, метод масс-спектрометрии.

**MASS-SPECTROMETRY STUDIES
OF OLIGOMERES COMPOSITION
OF POLYHEXAMETHYLENEGUANIDINE**

V. Lysytsya¹
A. V. Rebriev²
V. V. Polischuk¹

¹Agriculture Institute of West Polissya
of National Academy of Agrarian Sciences of
Ukraine, Rivne
²Palladian Institute of Biochemistry of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: lysytsya@ukr.net, rebriev@ukr.net

The results of mass-spectrometry studies of oligomere composition of polyhexamethyleneguanidine salts are given. Although polymer derivatives of guanidine are commonly applied as disinfectants, they are also capable to increase cell proliferation activity, regulate growth of microorganisms in biotechnology and stimulate germination of agriculture seeds. We have defined a construction of four types of oligomeres for polyhexamethyleneguanidine linear structure. They differ in composition of final groups. The identification, by means of mass-spectrometry, composition and constructions of the different sample polyhexamethyleneguanidine will hereinafter allow understanding the mechanisms of their biological activity. The variants of the mass-spectrometry method MALDI-TOF MS and TOF-PDMS were used. We have found that anion composition of polyhexamethyleneguanidine salts has a vital importance when ionizing in PDMS and little effect upon quality of the mass-spectra got by MALDI method.

Key words: polyhexamethyleneguanidine, oligomeres, mass-spectrometry method.