



УДК 615.28,547.458

Д. М. Година, Л. В. Кобріна, Л. Є. Калашнікова, Л. О. Метелиця,
С. П. Рогальський, О. П. Тарасюк, С. В. Рябов, С. В. Лаптії

Антимікробні властивості і токсичність імідазолієвих іонних рідин та їх комплексів з β -циклодекстрином

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Ю. Ю. Керчею)

Синтезовано водорозчинну і водонерозчинну іонні рідини на основі катіона 1-додецил-3-метилімідазолію, хлорид і тетрафтороборат відповідно. Отримано комплекси включення іонних рідин з β -циклодекстрином (β -ЦД) у мольному співвідношенні 1 : 1, структуру яких підтверджено методами ІЧ спектроскопії та диференційної сканувальної калориметрії. Встановлено антимікробну активність іонних рідин та їх комплексів з β -ЦД проти тест-культур *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853), *Candida albicans* (M 885 ATCC 10231) та *Candida albicans* (клінічний ізолят). Показано, що комплексоутворення іонних рідин з β -ЦД приводить до зниження їх токсичності.

В останні роки спостерігається підвищений інтерес до іонних рідин (ІР) як сполук з широким спектром фізичних, хімічних, біологічних властивостей і специфічних функцій. До ІР відносять сольові сполуки, які включають об'ємні органічні катіони та різноманітні органічні й неорганічні аніони і мають температуру плавлення нижче 100 °С. Завдяки поєднанню таких унікальних властивостей, як надзвичайно низька пружність парів, незаймистість, висока полярність і термічна стійкість, ІР знайшли широке застосування як альтернативні малотоксичні розчинники в органічному синтезі [1], полімерній хімії [2], ферментативному каталізі [3], а також як засоби доставки лікарських препаратів [4]. Широке вікно електрохімічних потенціалів багатьох ІР дозволяє успішно застосовувати їх як середовища для проведення електрохімічних реакцій [5], а також для розробки електрохімічних сенсорів і біосенсорів [6]. Крім того, ІР є надзвичайно перспективними модифікуючими домішками до різних полімерів. Так, наприклад, вони можуть бути прийнятними з екологічної точки зору заміниками токсичних пластифікаторів для полімерів, зокрема поліметилметакрилату [7], полівінілхлориду [8] тощо.

© Д. М. Година, Л. В. Кобріна, Л. Є. Калашнікова, Л. О. Метелиця, С. П. Рогальський, О. П. Тарасюк, С. В. Рябов, С. В. Лаптії, 2015

Останнім часом з'явилися нові публікації, присвячені дослідженню ІР на основі катіона 1,3-діалкілімідазолію як біоцидів нового типу з широким спектром антимікробної активності проти грампозитивних і грамнегативних бактерій, грибів, водоростей, а також біоплівки [9–11]. Антимікробні властивості таких сполук пояснюють здатність позитивно заряджених органічних катіонів легко проходити крізь клітинні мембрани мікроорганізмів з подальшим їх руйнуванням, цьому також сприяє наявність довгих вуглеводневих замісників [9, 10]. Встановлено, що збільшення довжини вуглеводневого радикала в катіоні імідазолію значно посилює антимікробну активність ІР, яка є максимальною для замісників C_{12} – C_{14} . Такі властивості дозволяють розглядати ІР як перспективні дезінфектанти, що є ефективними проти мультирезистентних мікроорганізмів та можуть знайти широке застосування в медичних і громадських установах. Крім того, ІР можуть бути ефективними домішками до різноманітних полімерних матеріалів та захисних покриттів для запобігання мікробного росту на їх поверхні.

Слід зауважити, що більшість досліджень антимікробної активності ІР проведено щодо водорозчинних сполук. Водночас, водонерозчинні ІР є привабливими як потенційні біоцидні домішки з високою стійкістю до вимивання з різних побутових та промислових матеріалів, що надзвичайно важливо з точки зору зменшення їх потенційної токсичності відносно організму людини та навколишнього середовища [8–10].

Одним з ефективних методів зниження токсичності таких іонних біоцидів є отримання їх комплексів включення з циклічними олігосахаридами — циклодекстринами.

Останнім часом циклодекстрини знайшли широке застосування в різних областях хімії, зокрема в супрамолекулярній хімії, тонкому органічному синтезі, аналітичній хімії та в багатьох інших напрямках. Підвищений інтерес до циклодекстринів обумовлений насамперед їх здатністю за рахунок внутрішньої гідрофобної порожнини утворювати численні комплекси включення з різноманітними молекулами-гостями. Серед інших переваг циклодекстринів слід відзначити їх нетоксичність, біодеградабельність і відносно дешевизну [12, 13].

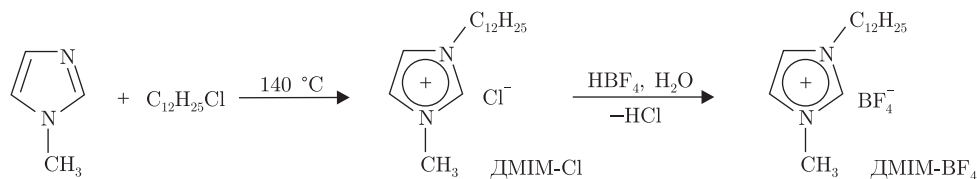
Особливу привабливість набувають циклодекстрини як допоміжні речовини в біохімічних дослідженнях і фармакології, де їх застосовують, головним чином, для інкапсулювання різних лікарських засобів. Таке інкапсулювання (утворення супрамолекулярних комплексів типу гість-хазяїн) зазвичай захищає ліки від біорозпаду, сприяє підвищенню їх розчинності у водному середовищі, а в ряді випадків доставці лікарських препаратів у потрібне місце організму людини ефективно і вибірково.

Таким чином, актуальним завданням як з наукової, так і практичної точки зору є розробка нових біоцидів та систем на їх основі, які б поєднували в собі високу антимікробну активність і безпечність для довкілля за рахунок низької токсичності і водостійкості. У цьому плані особливої уваги заслуговує розробка та вивчення комплексів ІР з різними циклодекстринами, зокрема β -циклодекстрином (β -ЦД).

Авторами цього повідомлення отримано ІР на основі катіона 1-додецил-3-метилімідазолію та їх комплексів з β -ЦД та проведено оцінку їх антимікробної активності та токсичності.

Експериментальна частина. *Синтез зразків ІР.* Для синтезу і очищення іонних рідин використовували такі реагенти і розчинники: 1-метилімідазол, 1-хлорододекан, тетрафтороборатна кислота (50%-й водний розчин) виробництва фірми “Fluka”, гексан, етилацетат, метиленхлорид, сульфат натрію (“Синбіас”, Україна).

Водорозчинну іонну рідину 1-додецил-3-метилімідазолій хлорид (ДМІМ-Cl) і водонерозчинну 1-додецил-3-метилімідазолій тетрафтороборат (ДМІМ- BF_4) отримували за схемою



Суміш 1-метилімідазолу (5 г, 0,06 моль) і 1-хлорододекану (14 г, 0,07 моль) нагрівали при перемішуванні до 120–140 °С впродовж 12 год. Після охолодження реакційної суміші до кімнатної температури отримували твердий аморфний продукт світло-коричневого кольору, який очищали подвійною перекристалізацією із суміші гексан–етилацетат (мольне співвідношення 6 : 1). Залишки розчинників видаляли у вакуумі 10 мбар при 70–80 °С. ІР ДМІМ-СІ має вигляд білого порошку з температурою плавлення 46–47 °С.

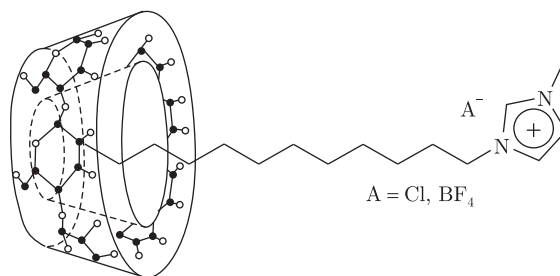
^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-D_6): $\delta = 0,85$ (т, 3H, CH_3 , $J = 7,2$ Гц), 1,24 (м, 18H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9$), 1,79 (м, 2H, NCH_2CH_2), 3,9 (с, 3H, NCH_3), 4,21 (т, 2H, NCH_2 , $J = 7,2$ Гц), 7,84 (д, 1H, C(2)H), 7,92 (д, 1H, C(3)H), 9,57 (с, 1H, C(1)H).

10 г (0,034 моль) сполуки ДМІМ-СІ розчиняли в 50 мл води і додавали при перемішуванні 10 мл 50%-го розчину тетрафтороборатної кислоти. Утворений водонерозчинний продукт у вигляді світло-коричневого масла екстрагували метиленхлоридом (2×50 мл) і промивали водою до нейтрального середовища. Органічний шар відділяли і сушили над сульфатом натрію. Метиленхлорид відганяли за нормальних умов, залишки розчинника видаляли у вакуумі 10 мбар при 80 °С впродовж 8 год. Отримували ІР ДМІМ- BF_4 у вигляді легкоплавкої сполуки світло-коричневого кольору з температурою плавлення 27–28 °С.

^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-D_6): $\delta = 0,84$ (т, 3H, CH_3 , $J = 7,2$ Гц), 1,25–1,31 (м, 18H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9$), 1,85 (м, 2H, NCH_2CH_2), 3,84 (с, 3H, NCH_3), 4,15 (т, 2H, NCH_2 , $J = 7,2$ Гц), 7,68 (д, 1H, C(2)H), 7,75 (д, 1H, C(3)H), 9,09 (с, 1H, C(1)H).

^{19}F ЯМР (188 МГц, DMSO-D_6): $\delta = -148,2$.

Отримання комплексів включення (КВ) ІР – β -ЦД. До 5%-го розчину ІР у 50%-му водному етанолі додавали еквімолярну кількість β -ЦД і перемішували суміш впродовж 12 год. Розчин випаровували, твердий залишок сушили 24 год при 120 °С. Ймовірну будову КВ ілюструє схема



На основі ДМІМ- BF_4 й β -ЦД були отримані також механічні суміші (мольне співвідношення 1 : 1).

Зразки (після висушування) досліджували методами ІЧ спектроскопії та диференційної сканувальної калориметрії (ДСК).

Антимікробну активність синтезованих ІР визначали проти ряду грампозитивного штаму *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), грамнегативних штамів *Escherichia coli* (ATCC-25922) та *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853), а також проти стандартного штаму гриба *Candida albicans* (M 885 ATCC 10231) та його клінічного ізоляту. Всі сполуки вивчали

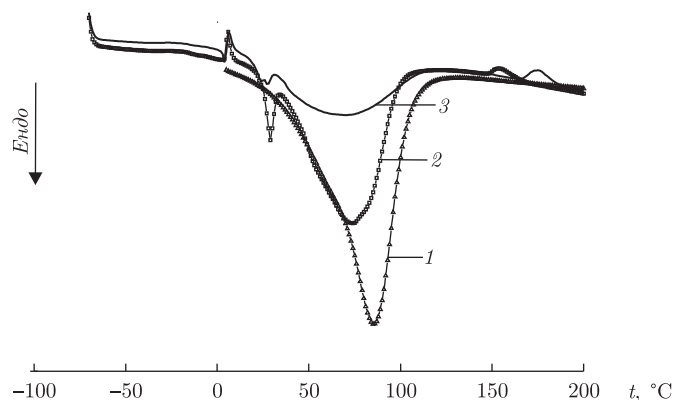


Рис. 1. Термограми нагріву: 1 — β -ЦД; 2 — механічна суміш ДМІМ- BF_4/β -ЦД (1 : 1); 3 — комплекс-включення ДМІМ- BF_4/β -ЦД (1 : 1)

в концентраціях 1,0, 0,1 й 0,01% диско-дифузійним методом [14]. Мікробне навантаження досліджуваних мікробних культур становило $1 \cdot 10^5$ колонієутворювальних одиниць в 1 мл (КУО/мл) культуральної рідини. Сполуки наносили на стандартні паперові диски в об'ємі 0,02 мл, інокулянт — на чашки Петрі в об'ємі 0,2 мл. Інкубацію проводили впродовж 18 год при 37 °С. Антимікробну активність виражали у міліметрах за діаметрами зон затримки росту мікроорганізмів.

Гостру токсичність (LD_{50}) цих зразків визначали *in vivo* на моделі гідробіонта Zebrafish (Danio rerio). За гранично допустиму концентрацію (LD_{50}) приймали 5,5 мг/л [15].

Результати та їх обговорення. Проведені методом ДСК дослідження механічної суміші ДМІМ- BF_4/β -ЦД (1 : 1) і комплексу β -ЦД/ДМІМ- BF_4 (1 : 1) підтверджують утворення комплексу-включення між ІР й β -ЦД. Відомо, що коли молекула-гість входить у порожнину β -ЦД, її теплофізичні характеристики змінюються. Так, на термограмі нагріву вихідної ДМІМ- BF_4 можна побачити склування в інтервалі температур від $-24,48$ до $-15,65$ °С та ендотермічний пік плавлення ($28,65$ °С). На кривій ДСК механічної суміші ДМІМ- BF_4 й β -ЦД (мольне співвідношення 1 : 1) реєструються як характеристики ДМІМ- BF_4 : склування, ендотермічний пік плавлення при $29,14$ °С, так і β -ЦД — ендотермічний пік при 73 °С, який відноситься до виділення кристалогідратної води з β -ЦД (рис. 1). На термограмі нагріву комплексу-включення спостерігаються такі зміни: зменшується пік плавлення ДМІМ- BF_4 і незначно зсувається у низькотемпературну область (25 °С), зменшується ендопік β -ЦД, пов'язаний з дегідратацією β -ЦД, що є підтвердженням утворення комплексу-включення.

Теплофізичні характеристики для системи водорозчинна ІР ДМІМ-Cl — β -ЦД мають аналогічний прояв (рисунок не наведено).

Результати мікробіологічних досліджень демонструє табл. 1.

Дані табл. 1 свідчать, що всі зразки ІР та їх комплекси включення з β -ЦД виявили високу бактеріостатичну та фунгістатичну активність у концентраціях 1,0 й 0,1%.

На рис. 2 графічно представлено усереднений рівень виявленої антибактеріальної та антифунгальної активності досліджуваних зразків ІР та їх комплексів із β -ЦД. Як видно з рис. 2, антибактеріальна активність водорозчинної ДМІМ-Cl перевищує активність водонерозчинної ДМІМ- BF_4 , однак антифунгальна навпаки — вища у зразка ДМІМ- BF_4 .

Комплекс включення ДМІМ-Cl з β -ЦД значно знижує як антибактеріальну, так і антигрибкову активності ІР. Антибактеріальна активність ДМІМ- BF_4 у комплексі з β -ЦД

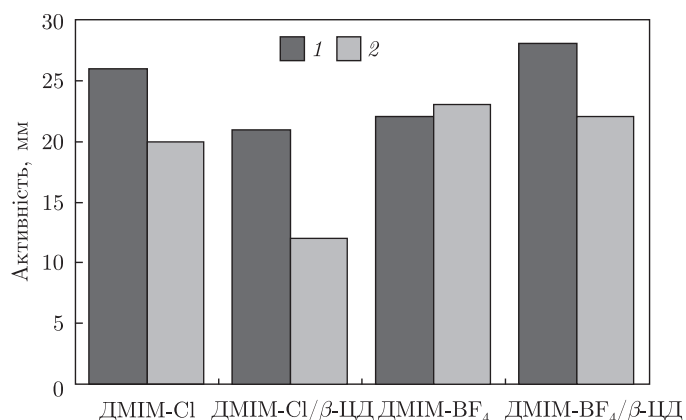


Рис. 2. Антимікробна активність іонних рідин та їх комплексів з β -циклодекстрином: 1 — антибактеріальна; 2 — антифунгальна

значно вища за таку ж активність цієї ж сполуки без β -ЦД. А протигрибкова активність DMIM-BF₄ й DMIM-BF₄ у комплексі з β -ЦД майже не відрізняється.

Дослідження гострої токсичності (LD₅₀) зразків ІР на моделі гідробіонта Zebrafish (*Danio rerio*) показали (рис. 3), що найбільш токсичною є ІР DMIM-Cl (LD₅₀ — 5 мг/л). Комплекс DMIM-Cl із β -ЦД у 8 разів менш токсичний — LD₅₀ становило 40 мг/л. Відповідно LD₅₀ для DMIM-BF₄ й DMIM-BF₄ з β -ЦД становило 7 й 100 мг/л.

Таким чином, водонерозчинна ІР DMIM-BF₄ майже у 1,5 раза менш токсична за водорозчинну ІР DMIM-Cl. Комплексоутворення цих ІР із β -ЦД істотно зменшує їх токсичність на 96,2 й 73,1% відповідно.

У цілому, синтезовані ІР на основі катіона 1-додецил-3-метилімідазолію та їх комплекси із β -ЦД показали високу антимікробну активність, що залежить як від досліджуваної концентрації зразків ІР, так і від виду мікробної культури. Комплексоутворення ІР з β -ЦД приводить практично до повної відсутності їх токсичних ефектів.

Таблиця 1. Антимікробна активність сполук за діаметрами зон затримки росту (мм) мікробних культур, $M \pm m$ ($n = 3$)

Зразок	Концентрація, %	Мікробні культури				
		<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>St. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	
					стандарт	ізолят
DMIM-Cl	1,0	30,7 ± 0,6	32,6 ± 0,3	34,6 ± 0,6	22,3 ± 0,3	24,6 ± 0,6
	0,1	16,0 ± 0,3	24,0 ± 0,3	22,3 ± 0,3	15,6 ± 0,6	18,7 ± 0,3
	0,01	H/a*	H/a	H/a	H/a	H/a
DMIM-Cl/β-ЦД	1,0	24,3 ± 0,6	22,9 ± 0,6	34,0 ± 0,9	15,3 ± 0,6	18,0 ± 0,3
	0,1	14,6 ± 0,6	12,6 ± 0,3	18,6 ± 0,6	H/a	12,3 ± 0,6
	0,01	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a
DMIM-BF ₄	1,0	22,9 ± 0,3	30,6 ± 0,7	32,3 ± 0,3	30,0 ± 0,3	28,0 ± 0,6
	0,1	10,6 ± 0,6	21,3 ± 0,9	11,6 ± 0,6	14,0 ± 0,6	22,0 ± 0,3
	0,01	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a
DMIM-BF ₄ /β-ЦД	1,0	24,6 ± 0,9	36,6 ± 0,6	40,7 ± 0,7	24,3 ± 0,6	26,3 ± 0,7
	0,1	15,3 ± 0,3	26,3 ± 0,3	26,6 ± 0,3	14,7 ± 0,3	22,6 ± 0,6
	0,01	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a

* Сполука не активна.

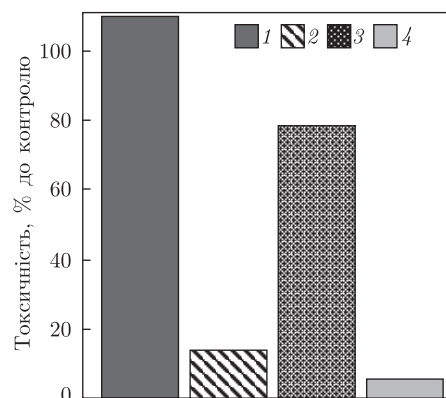


Рис. 3. Гостра токсичність іонних рідин та їх комплексів з β -циклодекстрином: 1 — ДМІМ-Cl; 2 — ДМІМ-Cl/ β -ЦД; 3 — ДМІМ-BF₄; 4 — ДМІМ-BF₄/ β -ЦД

1. Welton T. Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis // Chem. Rev. – 1999. – **99**, No 8. – P. 2071. – 2084.
2. Hong K., Zhang H., Mays J. et al. Conventional free radical polymerization in room temperature ionic liquids: a green approach to commodity polymers with practical advantages // Chem. Commun. – 2002. – **13**. – P. 1368–1369.
3. Naushad M., Alothman Z., Khan A., Ali M. Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: a review // Int. J. Biol. Macromol. – 2012. – **51**, No 4. – P. 555–560.
4. Shamshina J., Barber P., Rogers R. Ionic liquids in drug delivery // Expert Opin. Drug Deliv. – 2013. – **10**, No 10. – P. 1367–1381.
5. Quinn B., Ding Z., Moulton R., Bard A. Novel electrochemical studies of ionic liquids // Langmuir. – 2002. – **18**, No 5. – P. 1734–1742.
6. Singh V., Nigam A., Batra A. et al. Applications of ionic liquids in electrochemical sensors and biosensors // Int. J. Electrochem. – 2012. – Article ID 165683. – P. 1–17.
7. Scott M., Rahman M., Brazel C. Application of ionic liquids as low-volatility plasticizers for PMMA // Eur. Polym. J. – 2003. – **39**, No 10. – P. 1947. – 1953.
8. Dias A., Marceneiro S., Braga M. et al. Phosphonium-based ionic liquids as modifiers for biomedical grade poly(vinyl chloride) // Acta Biomater. – 2012. – **3**. – P. 1366–1379.
9. Docherty K., Kulpa C. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids // Green Chem. – 2005. – **7**. – P. 185–189.
10. Carson L., Chau P., Earle M. et al. Antibiofilm activities of 1-alkyl – 3-methylimidazolium chloride ionic liquids // Ibid. – 2009. – **11**. – P. 492–497.
11. Coleman D., Špulák M., Garcia M. T., Gathergood N. Antimicrobial toxicity studies of ionic liquids leading to a 'hit' MRSA selective antibacterial imidazolium salt // Ibid. – 2012. – **14**. – P. 1350–1356.
12. Rogalski M., Modarelli A., Magri P. et al. Physico-chemical properties and phase behavior of the ionic liquid- β -cyclodextrin complexes // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – **14**. – P. 16638–16655.
13. Brewster M., Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers // Adv. Drug Del. Rev. – 2007. – **59**. – P. 645–666.
14. Bauer A., Kirby W., Sherris J., Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method // Am. J. Clin. Pathol. – 1966. – **45**, No 4. – P. 493–496.
15. Шаляпин Г. Исследование действия биоцидов (на примере полигексаметиленгуанидинов) на гидробионтов различных систематических групп // Рыбохозяйств. токсикология. – 2010. – **11**, № 1(41). – С. 199–206.

Інститут біоорганічної хімії
та нафтохімії НАН України, Київ
Інститут хімії високомолекулярних сполук
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 19.09.2014

Д. М. Година, Л. В. Кобрина, Л. Е. Калашникова, Л. А. Метелица,
С. П. Рогальский, О. П. Тарасюк, С. В. Рябов, С. В. Лаптий

Антимикробные свойства и токсичность имидазолиевых ионных жидкостей и их комплексов с β -циклодекстрином

*Синтезированы водорастворимая и водонерастворимая ионные жидкости на основе катиона 1-додецил-3-метилимидазолия, хлорид и тетрафтороборат соответственно. Получены комплексы включения ионных жидкостей с β -циклодекстрином (β -ЦД) в мольном соотношении 1 : 1, структура которых подтверждена методами ИК спектроскопии и дифференциальной сканирующей калориметрии. Установлена антимикробная активность ионных жидкостей и их комплексов с β -ЦД против тест-культур *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853), *Candida albicans* (M 885 ATCC 10231) и *Candida albicans* (клинический изолят). Показано, что комплексобразование ионных жидкостей с β -ЦД приводит к снижению их токсичности.*

D. M. Hodyna, L. V. Kobrina, L. E. Kalashnikova, L. O. Metelytsia,
S. P. Rogalsky, O. P. Tarasyuk, S. V. Riabov, S. V. Laptiy

Antimicrobial properties and toxicity of imidazolium ionic liquids and their complexes with β -cyclodextrin

*Water soluble ionic liquid 1-dodecyl-3-methylimidazolium chloride and water resistant ionic liquid 1-dodecyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate have been synthesized. The inclusion complexes of ionic liquids with β -cyclodextrin in a molar ratio of 1 : 1 have been obtained. The structure of the complexes was confirmed by IR-spectroscopy and differential scanning calorimetry. Antimicrobial activity of both ionic liquids and their complexes with β -cyclodextrin has been established against *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853), *Candida albicans* (M 885 ATCC 10231), and *Candida albicans* (clinical isolate) test-cultures. It is found that the complex formation of ionic liquids with β -cyclodextrin considerably reduces their toxicity.*