

Nghiên cứu loại bỏ hexamethylenediamine trong tổng hợp polyhexamethylene guanidine

- Hà Cẩm Anh
- Phan Nguyễn Quỳnh Anh

Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG-HCM

- Nguyễn Trí
- Lưu Cẩm Lộc

Viện Công nghệ Hóa học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

(Bài nhận ngày 12 tháng 12 năm 2016, nhận đăng ngày 01 tháng 12 năm 2017)

TÓM TẮT

Polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG-HCl) là hợp chất kháng khuẩn có cấu trúc polymer mang điện tích dương với nhiều ưu điểm vượt trội như: phổ kháng khuẩn, kháng nấm rộng, có thể tiêu diệt vi khuẩn với nồng độ rất thấp, chất có độc tính cực thấp (cấp độ ba qua đường tiêu hóa và cấp độ bốn qua đường da). Tuy nhiên, do trong sản phẩm còn tồn dư chất tham gia phản ứng

hexamethylenediamine (HMDA) có tính độc thuộc loại trung bình, do đó sản phẩm vẫn gây kích ứng đến các vùng mô nhạy cảm. Vì vậy, bài báo đã nghiên cứu đưa ra qui trình tinh chế PHMG-HCl tối ưu để giảm nồng độ của HMDA trong sản phẩm từ 1,94 % xuống còn 0,42 %. Sau tinh chế, PHMG-HCl không gây kích ứng, đỏ mắt và dụi mắt đối với mắt thỏ trong thí nghiệm.

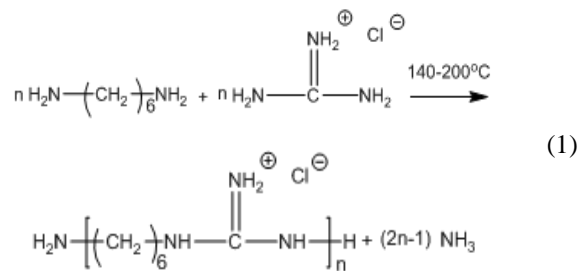
Từ khóa: Polyhexamethylene guanidine hydrochloride, hexamethylenediamine

MỞ ĐẦU

Tình hình ô nhiễm môi trường đang diễn biến một cách bất lợi, đáng báo động như hiện nay đã dẫn đến sự gia tăng đột biến của các bệnh nhiễm khuẩn trên thế giới [1]. Trên thị trường, các hợp chất kháng khuẩn được sử dụng rộng rãi trong cuộc sống hằng ngày và ở các bệnh viện, tuy nhiên chúng vẫn còn nhiều bất cập như gây hại môi trường (chlorine), ảnh hưởng đến sức khỏe khi sử dụng (chloramine B, chlorine), chi phí cao (pine tar), hoặc không đáp ứng được thẩm mỹ (methylene hay iodine). Phần lớn các hợp chất khử trùng đang được sử dụng ít nhiều đều có tính độc với con người và hệ sinh thái ở nồng độ nhất định. Để giải quyết vấn đề cấp bách trên, việc nghiên cứu đưa ra các hợp chất có khả năng kháng khuẩn cao, phổ rộng, vi sinh vật không kháng thuốc, không (hoặc ít) độc hại để phòng và chữa bệnh là hết sức cấp thiết. Polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG-HCl) là hợp chất kháng khuẩn

có cấu trúc polymer điện tích dương, ngày càng được sử dụng phổ biến hơn ở các hộ gia đình và trong các lĩnh vực công nghiệp khác nhau do độc tính tương đối thấp và thân thiện với hệ sinh thái. Polyguanidine được chứng minh có tính kháng khuẩn cả với vi khuẩn gram âm và gram dương, kháng nấm, kháng virus mạnh gấp 20 lần so với các amine bậc bốn khác [2]. PHMG-HCl là polymer hòa tan cao trong nước, không mùi, không màu, không gây ăn mòn và ít độc hại hơn các hợp chất khử trùng hiện đang sử dụng. Ngoài ưu điểm nổi trội là có tính kháng khuẩn vượt trội so với các hợp chất khác [3], PHMG-HCl còn là hợp chất có độc tính cực thấp (cấp độ ba qua đường tiêu hóa và cấp độ bốn qua đường da) đồng thời có thể giết chết vi khuẩn ở nồng độ rất thấp [4].

Thực tế, có rất nhiều phản ứng tổng hợp PHMG-HCl, nhưng để giảm thiểu sản phẩm phụ và các chất tham gia (độc tính cao) phản ứng (1) được sử dụng rộng rãi hơn cả [5].



Mặc dù PHMG-HCl được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, nhưng trong lĩnh vực dược phẩm và y khoa tiên tiến chưa có nhiều nghiên cứu ứng dụng loại polymer này. Nguyên nhân chủ yếu có thể là do hàm lượng chất tham gia hexamethylenediamine (HMDA) dư sau phản ứng trong PHMG-HCl tổng hợp. HMDA được phân loại là một hợp chất hóa học có mức độ độc hại loại trung bình, biểu hiện thấy rõ là kích ứng, gây ngứa, gây khó chịu đối với vùng tiếp xúc như da và mắt [6]. Để có thể sử dụng PHMG-HCl vào dược phẩm nói chung và nhãn khoa nói riêng thì đầu tiên phải loại bỏ lượng dư HMDA trong sản phẩm tạo thành. Do chưa có nghiên cứu nào thực hiện loại bỏ HMDA còn lại trong PHMG-HCl dẫn đến hạn chế trong mở rộng ứng dụng hợp chất diệt khuẩn này trong các sản phẩm có yêu cầu cao như dược phẩm. Do đó việc tổng hợp PHMG-HCl có mức độ tinh sạch cần thiết, cao cấp hơn phù hợp cho các cơ quan nhạy cảm cao trên cơ thể người để ứng dụng làm chất diệt khuẩn cần được nghiên cứu.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Hóa chất được sử dụng tổng hợp polyhexamethylene guanidine hydrochloride bao gồm hexamethylenediamine ($\geq 98\%$), guanidine hydrochloride ($\geq 99\%$), ethanol ($\geq 99,7\%$), sodium hydroxide ($\geq 99\%$).

Tổng hợp polyhexamethylene guanidine hydrochloride theo qui trình được trình bày ở công trình [7]. Đầu tiên guanidine hydrochloride (Gn-HCl) được gia nhiệt đến 140°C cho đến khi nóng chảy hoàn toàn. Tiếp theo thêm từ từ hexamethylenediamine (HMDA) với tỉ lệ mol của Gn-HCl:HMDA (1:1), vừa thêm HMDA vừa khuấy từ trong thời gian 60 phút. Phản ứng đa trùng ngưng

xảy ra đồng thời sinh ra khí NH_3 có mùi khai. Hỗn hợp phản ứng được tiếp tục gia nhiệt đến 160°C , duy trì ở nhiệt độ này trong 4 giờ. Sau đó đưa hỗn hợp về nhiệt độ phòng, sản phẩm PHMG-HCl chuyển dần từ dạng gel sang dạng rắn có màu vàng nhạt. Sản phẩm được phân tích $^1\text{H-NMR}$ để xác định cấu trúc, hàm lượng HMDA còn lại được xác định bằng phương pháp LC-MS trên thiết bị 6430 Triple Quad LC/MS, sử dụng cột eclipse pluss C18, pha động A: 0,1 % Formic/ H_2O , pha động B: acetonitrile 100 %, tốc độ dòng: 0,6 mL/phút, MS: Chế độ MRM: 116,9–100,1 (Frag 68; CE:10); 116,9–54,8 (Frag 68; CE:15).

Sản phẩm được tinh chế nhằm loại bỏ HMDA dư theo qui trình như sau: cho 50 % dung dịch PHMG-HCl/nước (w/w –khối lượng/khối lượng) phản ứng với dung dịch NaOH/ethanol. Sau phản ứng, chiết và thu lớp trên của hỗn hợp tách lớp. Loại bỏ lượng NaOH thừa bằng cách sục khí CO_2 , lọc kết tủa. Sau đó, cho sản phẩm tác dụng với HCl. Xác định lại lượng HMDA dư trong sản phẩm. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của phương thức cho polymer PHMG-HCl tương tác với dung dịch, thời gian phản ứng (τ) với dung dịch NaOH (C_{NaOH}), nồng độ dung dịch NaOH/nước, tỉ lệ các tác chất (NaOH:PHMG-HCl) cũng như ảnh hưởng số lần chiết (n) đến hàm lượng HMDA còn lại trong sản phẩm lần lượt được tiến hành khảo sát. Từ đó đưa ra quy trình làm sạch HMDA tối ưu.

Cuối cùng, thực hiện tinh chế PHMG-HCl theo qui trình tối ưu và xác định nồng độ PHMG-HCl bằng phương pháp khúc xạ kế [8].

Công thức tính toán hàm lượng polymer dựa vào chiết suất. Hàm lượng PHMG-HCl sau khi tổng hợp được tính toán theo công thức

$$Y = \frac{(n_D^{25} - n_{D_0}^{25})V}{Fg} \frac{100}{100 - W} \quad (2)$$

n_D^{25} : chiết suất của dung dịch PHMG-HCl ở 25 °C

$n_{D_0}^{25}$: chiết suất của nước ở 25 °C

F: hệ số đặc trưng của polymer

g: khối lượng chất tan

V: khối lượng hỗn hợp dung môi và chất tan

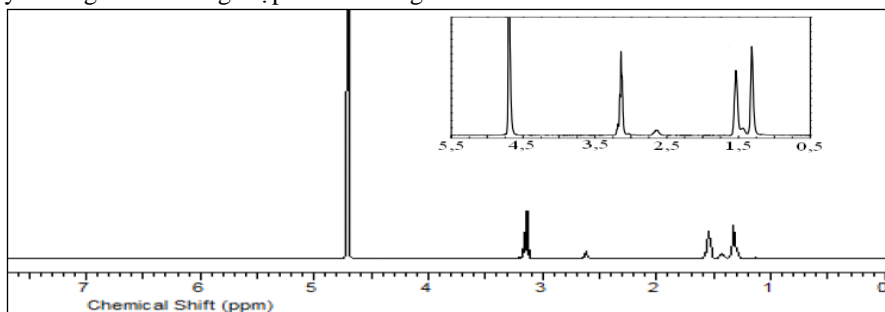
W: phần trăm khối lượng của dung dịch

Tiến hành thí nghiệm tiền lâm sàng để kiểm tra sơ bộ tác dụng phụ của sản phẩm lên 10 con mắt thỏ. Thời gian tiến hành thí nghiệm là 14 ngày, nhỏ 3 lần/ngày, với nồng độ là 0,05 %.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (Hình 1) của sản phẩm PHMG-HCl thu được có các peak đặc trưng tương tự như phổ $^1\text{H-NMR}$ do nhóm Yuanfeng Pan công bố [9] (Hình nhỏ). Điều này chứng tỏ đã tổng hợp thành công

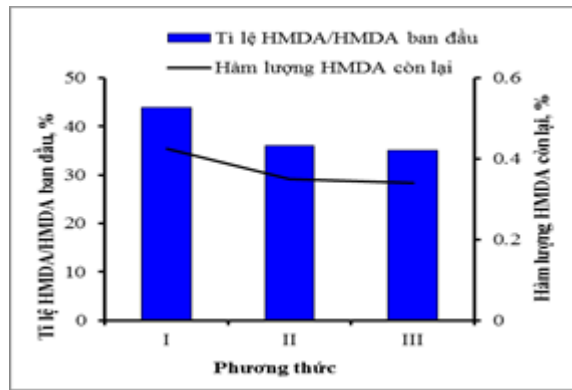
PHMG-HCl. Kết quả phân tích LC-MS cho thấy, sau khi tổng hợp hàm lượng HMDA dư trong sản phẩm PHMG-HCl còn tương đối thấp (1,94 %). Mặt khác, thí nghiệm sử dụng dung dịch PHMG-HCl nồng độ 0,05 % làm thuốc nhỏ mắt cho thấy mắt thỏ thí nghiệm bị kích ứng nhẹ (mắt bị đỏ, dụi mắt) sau 3 ngày thí nghiệm. Do vậy, vấn đề đặt ra tiếp theo là tối ưu qui trình loại bỏ HMDA dư trong sản phẩm.



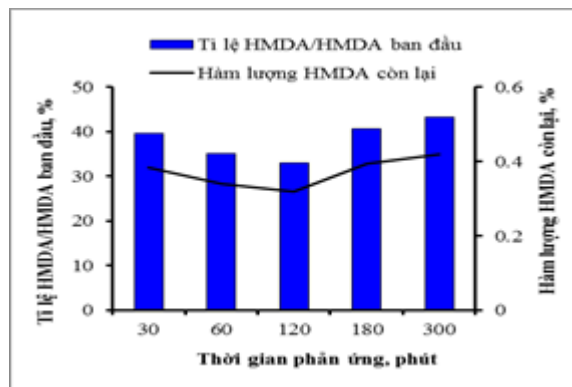
Hình 1. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của PHMG-HCl thu được

Ảnh hưởng của phương thức cho polymer tương tác với dung dịch đến khả năng loại bỏ HMDA: Trong thí nghiệm đã thực hiện ba phương thức cho polymer tương tác với dung dịch như sau: I) cho tác dụng đồng thời toàn bộ hỗn hợp; II) chia dung dịch polymer tương tác thành hai lần; và III) nhỏ dung dịch polymer từ từ vào dung dịch NaOH và ethanol. Hình 2 cho thấy khi tương tác toàn bộ lượng polymer

trong một lần thì kết quả loại bỏ HMDA là thấp nhất (HMDA còn lại 43,81 % so ban đầu). Kết quả loại bỏ HMDA theo phương thức II và III không có sự phân biệt lớn, tuy nhiên phương thức III dễ dàng thao tác hơn. Do đó, chọn phương thức nhỏ giọt (III) PHMG-HCl vào dung dịch để thực hiện khảo sát các bước tiếp theo.



Hình 2. Ảnh hưởng của phương thức cho PHMG-HCl với dung môi hữu cơ đến khả năng loại bỏ HMDA ($C_{\text{NaOH}} = 50\%$; NaOH:PHMG-HCl (1,5:1,0) $\tau = 180$ phút; $n = 1$ lần)



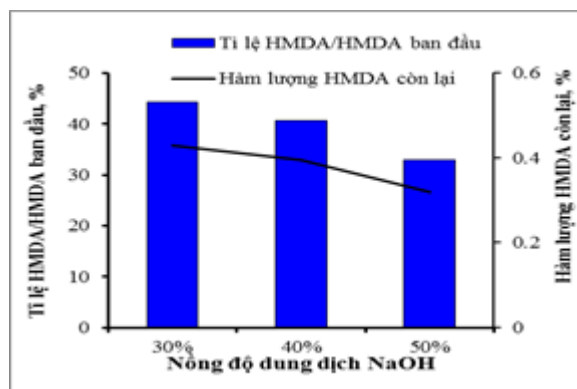
Hình 3. Khả năng loại bỏ HMDA theo thời gian phản ứng (phương thức tác dụng đồng thời; $C_{\text{NaOH}} = 50\%$; NaOH:PHMG-HCl (1,5:1,0); $n = 1$ lần)

Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến khả năng loại bỏ HMDA

Kết quả thí nghiệm (Hình 3) cho thấy, khi tăng thời gian phản ứng từ 30 phút lên 60 và 120 phút, hàm lượng HMDA còn lại trong sản phẩm giảm. Tuy nhiên, sau đó khi tiếp tục tăng thời gian phản ứng, hàm lượng HMDA lại có xu hướng tăng. Điều này có thể giải thích do thời gian phản ứng quá lâu sẽ khiến cho lượng HMDA trong nước (lớp dưới) hòa tan ngược lại vào dung môi hữu cơ (lớp trên) dẫn đến làm tăng hàm lượng HMDA trong sản phẩm. Từ kết quả thực nghiệm cho thấy, thời gian phản ứng 2 giờ cho hiệu quả loại bỏ HMDA trong sản phẩm là cao nhất (HMDA còn lại 0,64 %).

Ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến khả năng loại bỏ HMDA

Trong thí nghiệm đã sử dụng NaOH có nồng độ thay đổi trong khoảng 20–60 % (w/w) để khảo sát sự ảnh hưởng của NaOH đến khả năng loại bỏ HMDA trong sản phẩm. Ở nồng độ NaOH 20 và 60 % do tỉ lệ nước và NaCl trong hỗn hợp quá cao và quá thấp nên không có hiện tượng phân lớp. Trong khoảng nồng độ NaOH từ 30 % đến 50 % phản ứng diễn ra và sự phân lớp xuất hiện. Kết quả thí nghiệm ở Hình 4 cho thấy, hàm lượng HMDA giảm mạnh khi tăng nồng độ từ 30 % lên 40 % và với nồng độ NaOH 50 % hiệu quả loại bỏ HMDA tốt nhất, hàm lượng HMDA giảm chỉ còn 31,37 % so với ban đầu.

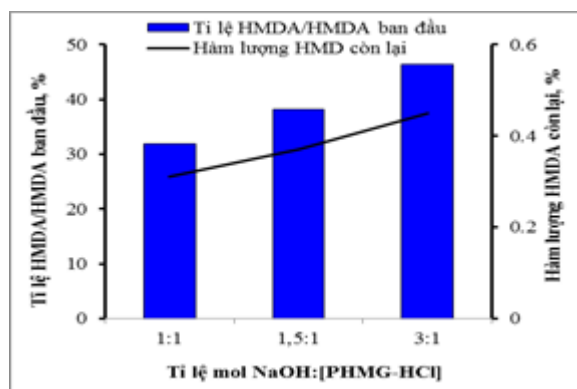


Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến khả năng loại bỏ HMDA (phương thức tác dụng đồng thời; NaOH:PHMG-HCl = 1,5:1; τ = 180 phút; n = 1 lần)

Ảnh hưởng của tỉ lệ tác chất đến khả năng loại bỏ HMDA

Tỉ lệ tác chất là một yếu tố quan trọng trong dịch chuyển cân bằng phản ứng. Theo lý thuyết thì 1 mol PHMG-HCl cần 1 mol NaOH tác dụng do đó chọn tỉ lệ mol NaOH:PHMG-HCl khảo sát 1:1 đến 3:1. Kết quả trong Hình 5 cho thấy hiệu quả loại bỏ HMDA tỉ lệ nghịch với tỉ lệ mol NaOH:PHMG-HCl. Ứng với tỉ lệ 1:1, hàm lượng HMDA còn lại là 0,62 %, trong khi đó nếu tăng lượng NaOH lên gấp 1,5 hoặc 3 lần, hàm

lượng HMDA còn lại sau tinh chế tăng lần lượt đến 0,74 và 0,90 %. Khi tăng lượng NaOH đưa vào phản ứng, lượng NaOH dư sau phản ứng sẽ tăng theo, dẫn đến lượng NaOH tan trong nước cũng tăng (gần tới điểm bão hòa của nước hơn), làm giảm lượng HMDA tan trong nước, nên một phần HMDA phân bố ngược lại trong dung môi hữu cơ. Do đó, lượng HMDA dư tăng khi tăng lượng NaOH phản ứng. Như vậy, tỉ lệ NaOH:PHMG-HCl = 1:1 (mol:mol) cho hiệu quả loại bỏ HMDA tốt nhất.

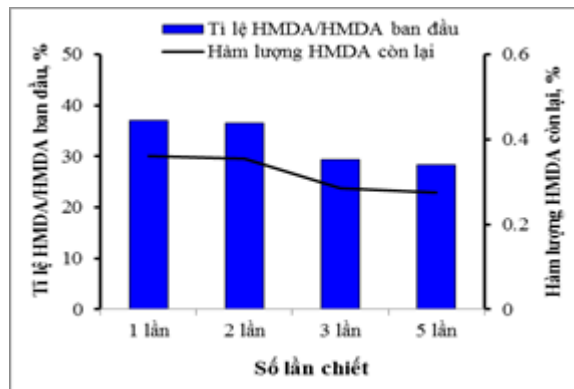


Hình 5. Ảnh hưởng của tỉ lệ mol NaOH:[PHMG-HCl] đến khả năng loại bỏ HMDA (phương thức tác dụng đồng thời; C_{NaOH} = 50 %; τ = 180 phút; n = 1 lần)

Ảnh hưởng số lần chiết đến khả năng loại bỏ HMDA

Kết quả thí nghiệm ở Hình 6 cho thấy khả năng loại bỏ HMDA tỉ lệ thuận với số lần chiết. Đặc biệt, khi tăng số lần chiết từ 2 lên 3 lần, lượng HMDA còn lại trong sản phẩm giảm mạnh từ 0,71 % xuống còn

0,57 %. Tiếp tục tăng số lần chiết lên 5 lần, hiệu quả loại bỏ tăng không đáng kể, hàm lượng HMDA chỉ giảm được 1,04 lần so với chiết 3 lần. Vậy phù hợp với cơ sở lý thuyết là chiết 3 lần cho hiệu quả tốt hơn cả.



Hình 6. Ảnh hưởng số lần chiết đến khả năng loại bỏ HMDA (phương thức tác dụng đồng thời; $C_{\text{NaOH}} = 50\%$; $\text{NaOH:PHMG-HCl} = 1,5:1$; $\tau = 180$ phút)

Từ nghiên cứu trên, chúng tôi đã xác định được qui trình tinh chế PHMG-HCl tối ưu. Nhỏ giọt từ dung dịch 50 % PHMG-HCl vào dung dịch 50 % NaOH trong ethanol, với tỉ lệ mol NaOH:PHMG-HCl là 1:1, khuấy từ trong vòng 2 giờ, và tiến hành chiết 3 lần. Kết quả phân tích cho thấy nồng độ HMDA còn lại là 0,42 %, bằng 21,64 % so với ban đầu và nồng độ PHMG-HCl thu được là 98,54 %. Như vậy, phương pháp loại bỏ nêu trên đã cho kết quả khả quan, giảm được hàm lượng khoảng 80 % HMDA. Sử dụng dung dịch 0,05 % sản phẩm PHMG-HCl tinh chế để làm thuốc nhỏ mắt diệt khuẩn trên mắt thỏ cho thấy không còn hiện tượng kích ứng trong 14 ngày. Như vậy, sản phẩm PHMG-HCl với hàm lượng như nêu trên đã giảm thiểu được những tác dụng phụ không mong muốn đến vùng mô tiếp xúc. Kết quả nghiên cứu tạo cơ sở để có thể nghiên cứu mở rộng ứng dụng PHMG-HCl vào ngành dược.

KẾT LUẬN

Đã tổng hợp thành công PHMG-HCl và khảo sát các yếu tố, gồm phương thức phản ứng, thời gian phản ứng, nồng độ chất tham gia, tỉ lệ mol các tác chất, số lần chiết đã xác định được qui trình phù hợp loại bỏ HMDA trong PHMG-HCl. Sau tinh chế nồng độ HMDA giảm xuống còn 0,42 % và nồng độ PHMG-HCl thu được là 98,54 %, phù hợp ứng dụng trong nhãn khoa. Kết quả nghiên cứu là cơ sở để nghiên cứu mở rộng ứng dụng PHMG-HCl vào ngành dược nói chung và nhãn khoa nói riêng.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ của Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG-HCM trong khuôn khổ đề tài T-KTHH-2016-38.

Investigation of hexamethylenediamine elimination in the synthesis of polyhexamethylene guanidine

- Ha Cam Anh
- Phan Nguyen Quynh Anh

University of Technology, VNU-HCM

- Nguyen Tri
- Luu Cam Loc

Institute of Chemical Technology, VAST

ABSTRACT

Polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG-HCl), a positively charged polymer, is the outstanding antibacterial with wide spectrum of antibacterial and antifungal, capable killing bacteria at very low concentration, and extremely low toxic (level three in the tract and level four through the skin). However, the residual of medium toxic reactant hexamethylenediamine in the synthesized PHMG-HCl

causes irritation to sensitive tissue areas. In this study the procedure for hexamethylenediamine elimination in the synthesis of polyhexamethylene guanidine was studied and proposed. After the treatment the concentration of HMDA in PHMG-HCl was reduced from 1.94 % to 0.42 % and the purified PHMG-HCl did not cause irritation and redness for rabbit's eyes.

Key words: Polyhexamethylene guanidine hydrochloride, hexamethylenediamine

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. P.R. Epstein, Climate change and emerging infectious diseases, *Microbes and Infection*, 3, 747–754 (2001).
- [2]. I. Johanson, P. Somasudaran, Handbook for cleaning/decontamination of surfaces, United Kingdom (2007).
- [3]. P. Wexler, Bruce Anderson, Encyclopedia of toxicology, India (2014).
- [4]. Gerald McDonnell, Denver Russel, Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance, *Clinical Microbiology*, 12, 1, 147–179 (1999).
- [5]. M. Albert, P. Feiertag, G. Hayn, R. Saf, H. Hönig, Structure-activity relationships of oligoguanidines-influence of counterion, diamine, and average molecular weight on biocidal activities, *Biomacromolecules*, 4, 6, 1811–1818 (2003).
- [6]. G.J. Kennedy, Toxicity of hexamethylenediamine, *Drug Chem Toxicol*, 28, 1, 15–33 (2005).
- [7]. S.A. Kedik, O.A. Bocharova, Ha Kam An, A.V. Panov, I.P. Sedishev, E.S. Zhavoronok, G.I. Timofeeva, V.V. Suslov, S.G. Beksaev, Structure and molecular-weight characteristics of oligohexamethyleneguanidine hydrochlorides, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 44, 10, 568–573 (2011).
- [8]. Государственная фармакопия, Moscow (2007)
- [9]. P. Yuanfeng, H. Xiao, G. Zhao, H. Beihai, Antimicrobial and thermal responsive layer by layer assembly based on ionic modified guanidine polymer and PVA, *Polymer Bulletin*, 61, 521–551 (2008).