

На правах рукописи

Гаркушина Ирина Сергеевна

МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СИСТЕМЕ
«АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ АНТИБИОТИК ЭРИТРОМИЦИН –
МОЛЕКУЛЯРНО ИМПРИНТИРОВАННЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ СОРБЕНТЫ»

03.01.02 – биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Санкт-Петербург – 2010

Работа выполнена на кафедре медицинской биотехнологии Факультета медицинской физики и биоинженерии ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет»

- Научный руководитель: кандидат химических наук,
доцент Писарев Олег Александрович
- Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
профессор Галль Лидия Николаевна;
кандидат химических наук,
доцент Глазова Наталья Владимировна
- Ведущая организация: ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский
государственный технологический
институт (технический университет)»

Защита состоится «15» июня 2010 года в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.229.25 при ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет» по адресу:

195251, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д. 5,
Факультет медицинской физики и биоинженерии, ауд. 305

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

Автореферат разослан « » _____ 2010 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат физико-математических наук, доцент



Власова О.Л.

Актуальность темы. Появление штаммов микроорганизмов, обладающих высокой резистентностью по отношению к большинству лекарственных препаратов, требуют использования высокоэффективных резервных средств, к числу которых относится антибактериальный антибиотик-макролид – эритромицин. Этот антибиотик включен в перечень «Жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств РФ».

Антибиотик эритромицин обладает широким антибактериальным действием в сочетании с низкой токсичностью. Эритромицин обладает высокой биологической активностью против грамположительных микроорганизмов, таких как гемолитические стрептококки группы А (*S. pyogenes*), пневмококки (*S. pneumoniae*), золотистые стафилококки (*S. aureus*) и др. Вместе с тем, антибиотик практически не действует на грамотрицательные бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.* и *Acinetobacter spp.*, поскольку не проникает через оболочку клеток этих микроорганизмов.

Антимикробное действие эритромицина обусловлено нарушением синтеза белка на этапе трансляции в клетках чувствительных микроорганизмов. Молекула антибиотика способна обратимо связываться с каталитическим пептидилтрансферазным центром рибосомальной 50S-субъединицы и вызывать отщепление комплекса пептидил-тРНК (представляющего собой растущую полипептидную цепь) от рибосомы. При этом нарушается цикличность последовательного присоединения полипептидной цепи к пептидилтрансферазному центру и акцепторному аминоксил-тРНК-центру 50S-субъединицы. Это приводит к ингибированию реакций транслокации и транспептидации. В результате приостанавливается процесс формирования и наращивания полипептидной цепи. Связывание макролидов с 50S-субъединицей возможно на любой стадии рибосомального цикла.

Таким образом, высокая эффективность и строгая избирательность антибактериального действия эритромицина главным образом определяются спецификой межмолекулярных взаимодействий антибиотика с природными рецепторами. Закономерности этих межмолекулярных взаимодействий, которые носят полифункциональный характер, могут быть интерпретированы при

моделировании на сорбционных системах, представляющих лекарственную субстанцию и полимерные сорбенты.

Систематическое изучение равновесия, кинетики и динамики сорбции эритромицина полимерными сорбентами различной структурной организации для понимания характера межмолекулярных взаимодействий эритромицина в биологических системах, с одной стороны, является актуальной междисциплинарной проблемой современной биофизики и медицинской биотехнологии, с другой - может явиться основой для создания сорбционного метода выделения высокоочищенной субстанции эритромицина.

Цели и задачи исследования. Целью исследований являлось изучение равновесия, кинетики и динамики межмолекулярных взаимодействий антибактериального антибиотика эритромицина с молекулярно импринтированными полимерными сорбентами и разработка сорбционного метода выделения и очистки эритромицина из очищенной культуральной жидкости гриба *Saccharopolyspora erythreus* с сохранением структуры молекулы антибиотика и его биологической активности.

Для реализации указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Синтез и исследование физико-химических свойств новых типов полимерных сорбентов молекулярно импринтированных антибиотиком, структурные особенности которых позволяют моделировать пептидилтрансферазный центр 50S субъединицы рибосомы.
2. Исследование природы межмолекулярных взаимодействий в биологических сорбционных системах на примере модельной системы «эритромицин – молекулярно импринтированные сорбенты».
3. Изучение равновесных и кинетических характеристик межмолекулярных взаимодействий эритромицина с молекулярно импринтированными сорбентами.
4. Исследование динамики межмолекулярных взаимодействий эритромицина с молекулярно импринтированными сорбентами.
5. Разработка физико-химических условий одноактного высокоселективного сорбционного процесса выделения эритромицина из очищенной

культуральной жидкости гриба *Saccharopolyspora erythreus* с сохранением структуры антибиотика и биологической активности.

Научная новизна. Для моделирования полифункционального связывания эритромицина с 50S рибосомальной субъединицей впервые синтезирован новый тип полимерных носителей, представляющих собой модель пептидилтрансферазного центра. Установлено, что увеличение количества метакрилата эритромицина в полимеризационной среде приводило к росту фактора импринтинга синтезированных полимерных сорбентов. Показано, что молекулярно импринтированные сорбенты способны наиболее селективно взаимодействовать с антибиотиком. Это позволило впервые использовать молекулярно импринтированные сорбенты для разработки метода выделения и очистки антибиотика из очищенной культуральной жидкости гриба *Saccharopolyspora erythreus* («нативный раствор»). На примере модельной системы «эритромицин – молекулярно импринтированные сорбенты» исследована природа межмолекулярных взаимодействий в биологических сорбционных системах. Установлен преимущественный вклад электростатических (ион-ионных) и гидрофобных взаимодействий эритромицина с полимерными сорбентами. Показано, что максимальная сорбция антибиотика наблюдалась при рН раствора, при котором карбоксильные группы полимерных сорбентов находились в частично ионизованном состоянии, а аминогруппы молекулы антибиотика – в полностью диссоциированном состоянии. Показан внутридиффузионный механизм кинетики межмолекулярного взаимодействия эритромицина с полимерными сорбентами. Впервые определены физико-химические условия осуществления одноактного сорбционного процесса выделения антибиотика с использованием молекулярно импринтированного полимерного сорбента БДМ-10 при сохранении биологической активности и нативной структуры молекулы эритромицина.

Практическая значимость. На основании проведенных исследований и теоретической обработки экспериментальных данных по равновесию, кинетике и динамике межмолекулярных взаимодействий эритромицина с молекулярно импринтированными полимерными сорбентами установлены оптимальные физико-химические условия реализации эффективного динамического процесса получения лекарственной субстанции эритромицина, сохраняющей нативную структуру и

высокую антибактериальную активность антибиотика. Проведено масштабирование параметров эффективного одноактного высокоселективного препаративного хроматографического метода получения эритромицина.

Апробация работы. Основные материалы диссертационной работы были представлены на 4-ом Международном Симпозиуме “Molecular Order and Mobility in Polymer Systems”(Санкт-Петербург, 2002), на 3-ем Международном Симпозиуме “Separations in BioSciences ”100 Years of Chromatography”(Москва, 2003), на Международном Симпозиуме “Preparative and Industrial Chromatography and Allied Techniques” (Аахен, 2004), на 5-ом Международном Симпозиуме “Molecular Order and Mobility in Polymer Systems”(Санкт-Петербург, 2005), на 2-ой и 3-ей Всероссийских научных конференциях с международным участием “Сорбенты как фактор жизни и здоровья” (Белгород, 2006; 2008), на 2-й, 3-ей и 4-ой Санкт-Петербургских конференциях молодых ученых с международным участием “Современные проблемы науки о полимерах” (Санкт-Петербург, 2006, 2007, 2008), на межвузовской научной конференции студентов и аспирантов «XXXVI-XXXVIII неделя науки СПбГПУ» (Санкт-Петербург, 2007, 2008, 2009).

Работа была поддержана грантами Правительства Санкт-Петербурга для молодых ученых (2008, 2009).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Оригинальный метод синтеза полимерных сорбентов, молекулярно импринтированных по отношению к эритромицину.
2. Закономерности и основные виды межмолекулярных взаимодействий антибактериального антибиотика эритромицина в биологических системах на примере системы «эритромицин – полимерные сорбенты». Анализ равновесных и кинетических параметров сорбции эритромицина молекулярно импринтированными полимерными сорбентами.
3. Оценка динамических параметров взаимодействия эритромицина с полимерными сорбентами с целью разработки эффективного метода получения лекарственной субстанции с сохранением ее нативной структуры.
4. Расчет параметров масштабирования одноактного высокоселективного препаративного хроматографического процесса получения эритромицина.

Личный вклад автора. Представленные в диссертации материалы получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор принимал участие в постановке задач, обработке, анализе и интерпретации полученных экспериментальных данных.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 18 работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, полученных экспериментальных результатов и их математической обработки, выводов, списка литературы, включающего 158 работ отечественных и зарубежных авторов. Работа изложена на 109 страницах и содержит 12 таблиц и 26 рисунков.

Материалы и методы.

Основным объектом исследования является антибактериальный антибиотик эритромицин. Эритромицин продуцируется лучистыми грибами *Saccharopolyspora erythreus*. Он относится к группе макролидов – соединений, содержащих в молекуле макроциклическое лактонное кольцо. По химической структуре эритромицин представляет собой полигидроксилактон, в состав которого входят два сахара: дезозамин (3-N-диметиламинодезоксисахар) и кладиноза, которая не содержит азота, но имеет одну метоксильную группу. Агликоновая часть молекулы (эритронолид) – это соединение лактонового строения, то есть имеет кольцо из тринадцати углеродов. Молекулярная масса эритромицина ($C_{37}H_{67}NO_{13}$) – 733,9 Да. В своей структуре эритромицин содержит аминную ионогенную группу ($pK_a = 8,6$).

В качестве полимерных сорбентов использовали синтезированные в ходе выполнения работы молекулярно импринтированные полимерные сорбенты серии БДМ – гетеросетчатые карбоксильные катиониты, являющиеся сополимерами метакриловой кислоты (МАК), диметакрилата этиленгликоля (ДМЭГ) и метакрилата эритромицина (МЭ), а также известные полимерные сорбенты: сульфокатионит MN-500 (сульфированный изопористый сополимер стирола и дивинилбензола) и карбоксильный катионит БД-24 (сополимер МАК и ДМЭГ).

Коэффициенты набухания определяли в ионизированной, неионизированной и полуионизированной формах по увеличению объема набухших сорбентов.

Полную обменную емкость по иону Na^+ определяли методом титрования отдельных навесок. По полученным экспериментальным данным строили кривые титрования, из которых определяли объем раствора в точке эквивалентности. Найденную таким образом статическую обменную емкость сравнивали с теоретической, рассчитанной по формуле:

$$ПОЕ = \frac{1000 \cdot a}{\varepsilon \cdot b}, \text{ мг-экв/г} \quad (1)$$

где a – вес мономера, г.; b – вес мономерной смеси, г.; ε – эквивалентный вес мономера, г.

Потенциометрическое титрование полимерных сорбентов проводили методом отдельных навесок. Основой метода является эмпирическое уравнение Гендерсона-Гассельбаха:

$$\text{pH} = \text{pK}_\alpha + n \cdot \lg \left(\frac{\alpha}{1-\alpha} \right), \quad (2)$$

где pK_α – кажущаяся константа ионизации функциональных групп сорбента, α – степень ионизации функциональных групп, n – параметр кооперативности, зависящий от природы противоиона и строения полимерной матрицы. Константа n определяется электростатическим взаимодействием соседних функциональных групп при ионизации полиэлектролита.

Фактор импринтинга или специфическая избирательность, возникающая благодаря включению целевого объекта в полимеризационную среду, определялся как отношение коэффициентов удерживания веществ на колонке с молекулярно импринтированным полимером и на колонке с его «ненастроенным» аналогом.

$$IF = \frac{K'_{\text{МИС}}}{K'_{\text{НИС}}}, \quad (3)$$

где $K'_{\text{МИС}}$ – коэффициент удерживания вещества на молекулярно импринтированном сорбенте; $K'_{\text{НИС}}$ – коэффициент удерживания вещества на неимпринтированном сорбенте.

$$K' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0} \quad (4)$$

где t_r – время задержки образца; t_0 – время выхода свободного объема колонки.

Равновесные и кинетические параметры сорбции эритромицина исследовали в статических условиях спектрофотометрическим методом, основанном на способности эритромицина поглощать ультрафиолетовый свет при $\lambda = 210$ нм. Для определения равновесной концентрации эритромицина использовали калибровочную кривую, которая имела прямолинейный участок до $C = 0,025$ мг/мл. Сорбционную емкость катионита находили по формуле:

$$m = \frac{(C - C_{равн}) \cdot V}{q} \cdot 1000, \text{ мг/г} \quad (5)$$

где C – начальная концентрация эритромицина в растворе, мг/мл; $C_{равн}$ – равновесная концентрация антибиотика, мг/мл; V – объем раствора, мл; q – масса навески сорбента, г.

Математическую обработку экспериментальных данных по кинетике межмолекулярного взаимодействия эритромицина с полимерными сорбентами осуществляли по модели Бойда:

$$\bar{D} = 0,087 \cdot \text{tg}^2 \beta \cdot R^2, \quad (6)$$

где \bar{D} – эффективный коэффициент диффузии, $\text{см}^2/\text{с}$; R – радиус зерна сорбента в набухом состоянии, мкм; β – угол наклона линейного участка кривой $F = f(\sqrt{t})$; F – степень заполнения ионита органическим ионом за время t .

Среднее время сорбции по модели Бойда вычисляли следующим образом:

$$\bar{t} = \int_0^1 t \left(\frac{\partial F}{\partial t} \right) dt = \int_0^1 t dF, \text{ мин.} \quad (7)$$

В случае внутридиффузионной кинетики в сферическое зерно сорбента:

$$\bar{t} = \frac{R^2}{15 \cdot \bar{D}}, \text{ мин.} \quad (8)$$

Динамику взаимодействия эритромицина с полимерными сорбентами изучали на лабораторных колонках размером $D \times H = 15 \text{ мм} \times 50 \text{ мм}$. Исследовали влияние импринтирования катионита на характер динамического режима взаимодействия эритромицина с полимерными сорбентами.

Результаты и их обсуждение.

Синтез молекулярно импринтированных сорбентов.

Молекулярный импринтинг представляет собой способ получения синтетических полимеров-носителей, в которых имеются специфические центры связывания, обладающие высокой селективностью по отношению к целевой молекуле.

Синтез молекулярно импринтированных сорбентов включает три стадии (рис.1). Первая стадия состоит в функционализации мономера путем осуществления межмолекулярного взаимодействия между целевым объектом и мономером (это взаимодействие может быть как ковалентным, так и нековалентным). На второй стадии происходит синтез полимерной сетки, включающей мономер, функциональный мономер и сшивающий агент. Далее, целевой объект удаляется из полимерной сетки путем разрушения его взаимодействий с мономером. Полученные таким образом сорбенты сохраняют «молекулярную память» о целевом объекте и способны высокоспецифично взаимодействовать с ним в присутствии других молекул.

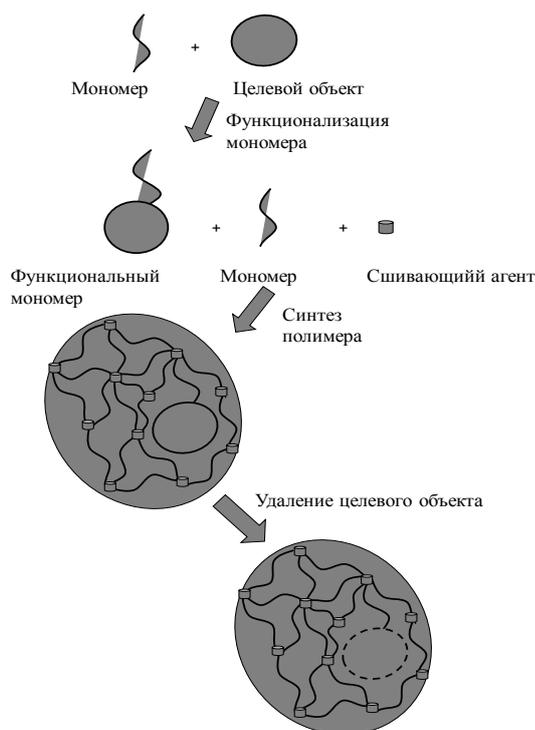


Рис. 1. Принцип синтеза молекулярно импринтированных полимерных сорбентов.

Импринтирование сорбентов путем включения эритромицина в полимерную матрицу при синтезе позволило создать полимерную модель центра связывания 50S рибосомальной субъединицы.

Для создания молекулярно импринтированных эритромицином полимерных сорбентов на первом этапе была получена соль МАК и эритромицина – МЭ. Предварительными экспериментами было установлено, что подходящим растворителем для введения в мономерную смесь до 20 мол. % МЭ являлся 45 % водный *n*-пропанол, при концентрации мономеров в растворителе равной 20 %.

Эксперименты по полимеризации МАК и МЭ проводили в ампулах в токе аргона при комнатной температуре в присутствии 1 % окислительно-восстановительной системы: персульфат аммония (ПА) – аскорбиновая кислота (АК) в качестве инициатора и 12 мол. % ДМЭГ в качестве сшивающего агента. По окончании экзотермической реакции осуществляли прогрев образцов в течение часа на кипящей водяной бане. Затем образцы заливали десятикратным избытком 1н HCl на 10-12 часов для разрушения МЭ и перевода хлорида эритромицина в раствор. Далее образцы промывали дистиллированной водой и последовательно обрабатывали десятикратным избытком 0,5н NaOH для удаления непрореагировавших мономеров, водой и 0,5н HCl, а далее отмывали водой до нейтральной реакции по метилоранжу. Для дальнейших исследований использовали фракцию с размером зерен 125-300 мкм.

Синтезированная серия сорбентов в дальнейшем именуется БДМ-0, БДМ-5, БДМ-10, БДМ-20. Цифра обозначает мольный процент введенного в мономерную смесь МЭ. Сорбент БДМ-0 в дальнейшем именуется контрольным сорбентом.

Максимальный экзотермический эффект реакции сополимеризации и максимальный выход наблюдался для образца БДМ-0. С увеличением вводимого МЭ выход и прочность полимера снижались. Сополимер БДМ-20 представлял собой слабосшитый гель, на поверхность которого вследствие контракции выделялся порошкообразный эритромицин. По этой причине дальнейшее увеличение содержания в полимеризационной смеси МЭ не проводили.

Изучение физико-химических и электрохимических свойств синтезированных сорбентов.

Синтезированные образцы сорбентов были охарактеризованы по ряду физико-химических и электрохимических параметров: насыпная плотность (ρ), набухание в H^+ - и Na^+ -форме ($K_{наб.ион}$ и $K_{наб.неион}$), полная обменная емкость (ПОЕ), pK_{α} и кооперативность процесса ионизации карбоксильных групп – n (табл.1).

Табл. 1. Физико-химические и электрохимические свойства контрольного и молекулярно импринтированных сорбентов.

Наименование сорбента	Физико-химические свойства					
	$K_{наб.ион}$	$K_{наб.неион}$	ρ , г/см ³	ПОЕ	pK_{α}	n
БДМ-0	4,8	9,2	0,71	6,6	6,6	1,73
БДМ-5	4	9,8	0,71	5,4	6,7	1,44
БДМ-10	2,8	10,2	0,71	5,4	6,3	1,36
БДМ-20	2,3	16,4	0,73	5,4	6,6	1,58

Как видно из представленных данных, с увеличением вводимого при полимеризации МЭ уменьшалась величина параметра n , который характеризует кооперативность процесса ионизации фиксированных групп. Кроме того, присутствие МЭ приводило к уменьшению полной обменной емкости импринтированных сорбентов за счет меньшего количества фиксированных ионогенных групп в сетчатой матрице сорбента.

Равновесие межмолекулярного взаимодействия эритромицина с молекулярно импринтированными полимерными сорбентами.

Модель равновесного взаимодействия биологически активных молекул и импринтированных полимерных сорбентов позволяет более подробно интерпретировать природу поведения этих молекул в сложных биологических системах.

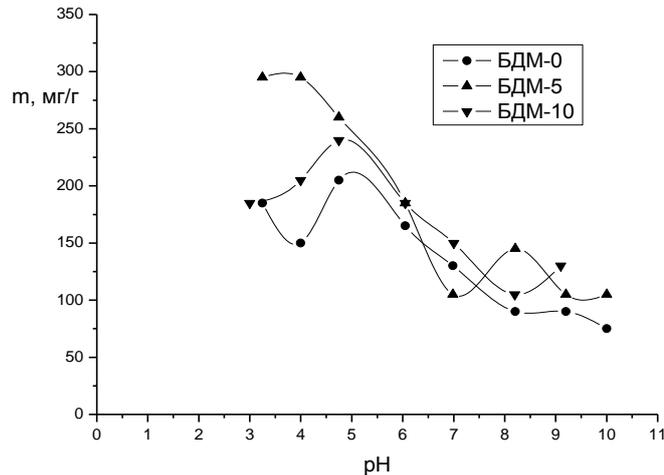


Рис. 2. Зависимости сорбции эритромицина на молекулярно импринтированных сорбентах от pH. Относительная погрешность определения равновесной сорбционной емкости составляла 5%.

На рис. 2 представлены кривые зависимости сорбционной емкости импринтированных полимерных сорбентов по эритромицину от pH равновесного раствора.

Абсолютные значения сорбционных емкостей эритромицина на молекулярно импринтированных сорбентах превышали значения сорбционных емкостей, характерных для контрольного сорбента БДМ-0. Для сорбента БДМ-5 кривая характеризуется уменьшением сорбционной емкости при увеличении значений pH раствора. При увеличении pH свыше 7,0 происходила сорбция эритромицина, характерная для карбоксильных катионитов. В области pH=7,0-8,0 наблюдалось незначительное увеличение сорбционной емкости за счет взаимодействия диссоциированных молекул эритромицина с ионизированной формой сорбента. При увеличении pH в сторону щелочных значений происходил переход аминогруппы антибиотика в неионизированное состояние. Это объясняет уменьшение равновесной емкости сорбции эритромицина в этой области pH.

Зависимости сорбции эритромицина от pH на сорбентах БДМ-0 и БДМ-10 описывались кривой с максимумом. Такой характер зависимостей определяется конкуренцией процессов ионизации карбоксильных групп сорбента и диссоциации молекул антибиотика. При $\text{pH}=\text{pK}_a-2$ карбоксильные группы в матрице сорбента находятся в недиссоциированном состоянии. Следовательно, при $\text{pH}=4,0$ степень ионизации карбоксильных групп в катионитах близка к 0 и, соответственно, при

этом значении рН наблюдалось гидрофобное взаимодействие диссоциированных молекул эритромицина с неионизированной формой сорбента. При увеличении рН до 5,0 происходила постепенная ионизация карбоксильных групп, вследствие чего наблюдалось увеличение емкости сорбции. При дальнейшем увеличении рН наблюдалось снижение величины емкости сорбции за счет взаимодействия частично ионизированных молекул антибиотика с ионизированной формой сорбента.

Кинетика взаимодействия эритромицина с полимерными сорбентами.

Исследование равновесных закономерностей межмолекулярных взаимодействий является необходимым, но недостаточным условием для полного понимания механизма связывания антибиотика в биологических системах. В связи с этим очень важным этапом изучения является исследование кинетики межмолекулярного взаимодействия эритромицина с полимерными сорбентами. Исследование кинетики сорбции эритромицина на молекулярно импринтированных сорбентах при различных рН позволило определить особенности гетерогенного массопереноса в системе «эритромицин – сорбент» в зависимости от состояния ионизации матрицы сорбента и антибиотика.

Расчет по экспериментальным кинетическим кривым позволяет определить эффективные коэффициенты диффузии, представляющие неизвестную комбинацию истинных коэффициентов самодиффузии обменивающихся ионов. При этом считается, что стадиями, определяющими скорость ионообменного процесса (лимитирующими стадиями), являются либо диффузия ионов через «пленку» раствора, либо диффузия внутри частицы ионита и значительно реже смешанный тип кинетики сорбции.

Так как внешнедиффузионная кинетика, так же как и смешанные типы кинетики, не дает линейного участка на зависимости степени заполнения сорбента органическим ионом от корня квадратного из времени эксперимента, то из рис. 3 следует, что межмолекулярное взаимодействие эритромицина с синтезированными сорбентами при рН=6,0, соответствующем рН нативного раствора *Saccharopolyspora erythreus*, лимитируется внутридиффузионным механизмом кинетики сорбции.

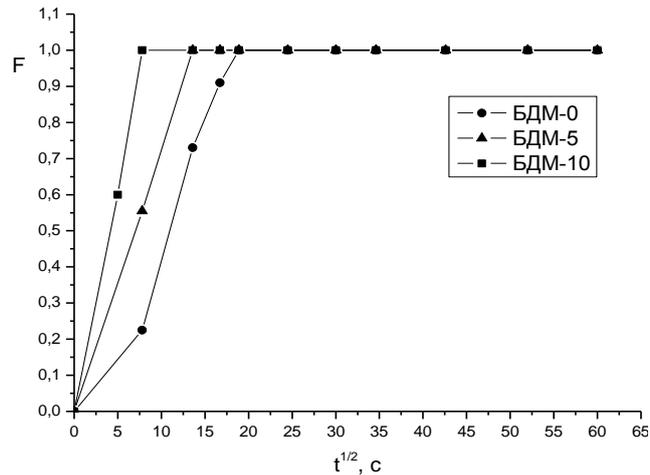


Рис. 3. Зависимость степени заполнения ионита органическим ионом (F) от корня квадратного из времени эксперимента (рН 6,0).

Линейный участок кинетической кривой позволяет использовать простой метод определения эффективных коэффициентов диффузии по величине углового коэффициента кинетической кривой. Для расчёта эффективных коэффициентов диффузии в импринтированные и контрольный сорбент использовались формулы Бойда для внутридиффузионной кинетики сорбции.

В табл. 2 представлены рассчитанные кинетические характеристики межмолекулярного взаимодействия эритромицина с молекулярно импринтированными сорбентами при различных рН раствора.

Табл. 2. Кинетика межмолекулярного взаимодействия эритромицина с молекулярно импринтированными сорбентами.

Сорбент	рН	$\bar{D} * 10^{-8}, cm^2/c$	$\bar{t}, мин$
БДМ-0	3,5	0,82	15,3
	6,0	2,34	5,36
	9,1	16,1	0,78
БДМ-5	3,5	16,1	0,78
	6,0	5,47	2,29
	9,1	16,1	0,78
БДМ-10	3,5	16,1	0,78
	6,0	16,1	0,78
	9,1	5,47	2,29

\bar{D} – эффективный коэффициент диффузии, cm^2/c ; \bar{t} – среднее время сорбции, мин.

Исследование кинетики сорбции эритромицина на контрольном сетчатом полиэлектrolите БДМ-0 показало, что сорбент обладал наибольшим эффективным коэффициентом диффузии и, соответственно, наименьшим средним временем сорбции при рН 9,1. Это связано с высокой доступностью сорбционных центров за счет более высокой набухаемости матрицы полиэлектrolита и преобладания электростатических взаимодействий, так как карбоксильные группы сорбента и практически все молекулы антибиотика ($pK_a = 8,6$) находятся в диссоциированном состоянии. При рН 6,0 наблюдался рост среднего времени сорбции эритромицина за счет увеличения времени прохождения ионов к вакантным сорбционным центрам сетчатого полиэлектrolита. Кроме того, при данном рН раствора происходило взаимодействие диссоциированных групп антибиотика с полудиссоциированными группами сорбента. При рН 3,5 наблюдалось ухудшение кинетических характеристик сорбции эритромицина на катионите БДМ-0 вследствие неионного характера взаимодействия антибиотика с сорбентом при данном значении рН. Кроме того, в этих условиях сорбционные центры труднодоступны для ионов эритромицина из-за сжатия матрицы полиэлектrolита.

Для молекулярно импринтированного полиэлектrolита БДМ-5 наибольший эффективный коэффициент диффузии и наименьшее среднее время сорбции наблюдались при рН 3,5 и 9,1. При рН 3,5 преобладали гидрофобные взаимодействия молекулы антибиотика в комплементарных полостях сорбента, а также происходило сжатие матрицы сорбента, вследствие чего более доступными оставались только поверхностные сорбционные центры. Поэтому при данном значении рН наблюдался наибольший эффективный коэффициент диффузии и, соответственно, наименьшее среднее время сорбции. При рН 9,1 сорбционные центры более доступны за счет импринтирования матрицы полиэлектrolита и ее большей набухаемости, а также при данном значении рН преобладали электростатические взаимодействия диссоциированных групп сорбента с частично ионизированными молекулами антибиотика.

Изучение кинетики сорбции эритромицина на молекулярно импринтированном полиэлектrolите БДМ-10 показало, что лучшими кинетическими характеристиками сорбент обладает при рН 3,5 и 6,0. При рН 3,5 меньшее количество сорбционных центров доступно для гидрофобных

взаимодействий с ионами эритромицина. При рН 9,1 за счет высокой набухаемости и эффекта импринтинга увеличивалось расстояние прохождения ионов эритромицина до заряженных карбоксильных групп полиэлектролита, так как карбоксильные группы в сорбенте реже расположены за счет введения большего количества МЭ при синтезе. Это приводило к меньшей величине эффективного коэффициента диффузии и большему среднему времени сорбции. При рН 6,0, который близок к рН нативного раствора *Saccharopolyspora erythreus*, наиболее четко проявлялся эффект импринтинга матрицы катионитов, так как сорбенты были синтезированы при этом значении рН и, соответственно, сорбционные центры комплементарны конформации молекулы антибиотика именно в этой области. Кроме того, сорбция происходила по ионообменному механизму, так как карбоксильные группы сорбента при данном значении рН находились в полудиссоциированном состоянии, а аминогруппа антибиотика в диссоциированном состоянии.

Наибольшее значение эффективного коэффициента диффузии, а, следовательно, и наименьшее значение среднего времени сорбции наблюдались при сорбции эритромицина на молекулярно импринтированном сорбенте БДМ-10. Значения эффективных коэффициентов диффузии имели порядок $\sim 10^{-8}$ см²/с, что позволило в динамических экспериментах использовать малые величины скоростей подвижной фазы при сохранении квазиравновесного режима сорбции.

Межмолекулярные взаимодействия эритромицина с полимерными сорбентами в динамических условиях.

Исследование динамики межмолекулярного взаимодействия в модельных сорбционных системах необходимо для подробной интерпретации механизма квазиравновесного связывания, характерного для сложных биологических сорбционных систем. Исследование динамики связывания эритромицина с использованием различных элюентов позволило определить характер межмолекулярных взаимодействий в системе «эритромицин – полимерный катионит» и выявить оптимальный элюент, обеспечивающий высокую десорбцию антибиотика. Это необходимо для разработки сорбционного метода выделения и очистки эритромицина с сохранением нативной структуры его молекулы.

На рис. 4-6 представлены кривые элюции эритромицина с синтезированных полимерных сорбентов БДМ-0, БДМ-5 и БДМ-10. Исследования проводили на аналитической колонке $D \times H = 15 \text{ мм} \times 50 \text{ мм}$, скорость подвижной фазы составляла 0,25 мл/мин. Сорбцию антибиотика осуществляли из фосфатного буфера с ионной силой (I) 0,2 М и pH 5,35. В качестве элюентов использовали фосфатный буфер с pH 9,2 и I=0,2 М; а также 0,2 М и 0,4 М водные растворы CaCl_2 , где ионы Ca^{++} выступали в качестве вытеснителя молекул эритромицина с сорбционных центров полиэлектролитов. Характер элюиционных кривых свидетельствовал о полифункциональном связывании в системе «эритромицин – полиэлектролит» для всех исследуемых сорбентов.

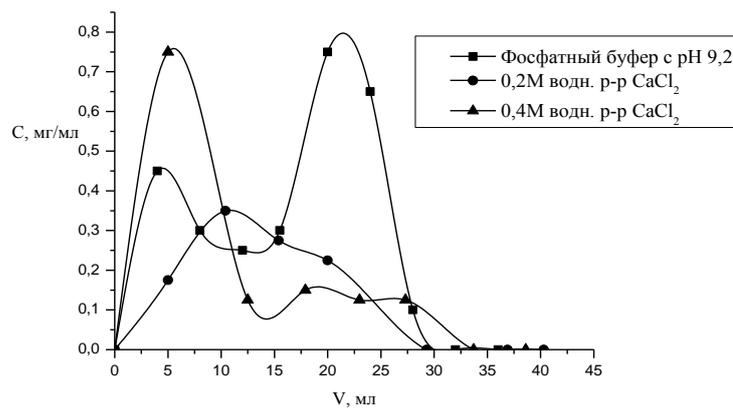


Рис. 4. Влияние состава элюента на характер десорбции эритромицина с контрольного полимерного сорбента БДМ-0.

Разделение пиков на кривой элюции эритромицина с гетеросетчатого полиэлектролита БДМ-0 при использовании фосфатного буфера с pH 9,2 в качестве элюента характеризует последовательное нарушение гидрофобных и электростатических взаимодействий антибиотика с полимерным сорбентом.

Под действием вытеснителя (0,2М CaCl_2) нарушение ион-ионных взаимодействий происходило гораздо легче, в результате чего наблюдалось слияние пиков на кривой элюции. При увеличении концентрации ионов Ca^{++} в элюенте происходило образование резких границ концентрационного профиля эритромицина и увеличивался выход антибиотика до 70% (при использовании фосфатного буфера с pH 9,2 выход составил 60%).

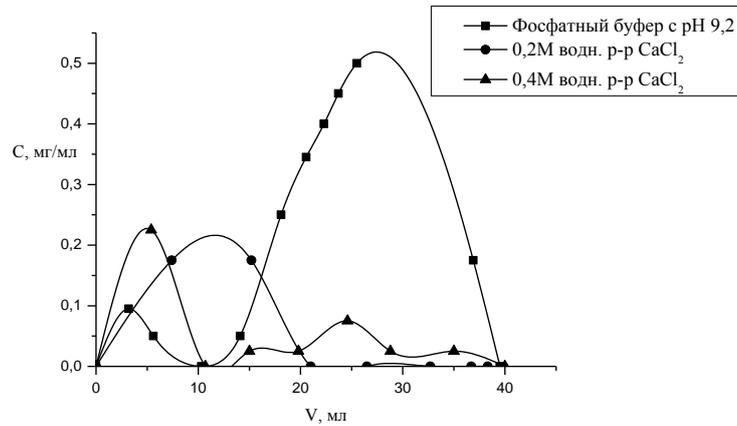


Рис. 5. Влияние состава элюента на характер элюции эритромицина с молекулярно импринтированного сорбента БДМ-5.

Кривая элюции эритромицина с молекулярно импринтированного сорбента БДМ-5 фосфатным буфером с pH 9,2 также имела два пика, которые характерны для нарушения молекулярных и электростатических взаимодействий.

При использовании вытеснителя происходило практически одновременное нарушение полифункциональных взаимодействий, что отражалось в появлении единственного широкого пика. При увеличении концентрации вытеснителя наблюдалось образование резких границ концентрационного профиля антибиотика и вытеснение молекул эритромицина с более глубоко расположенных комплементарных молекуле антибиотика сорбционных центров. Это приводило к увеличению выхода антибиотика до 90%.

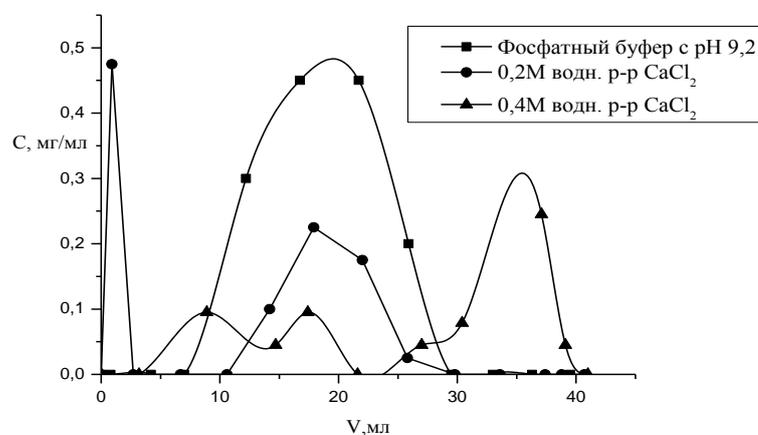


Рис. 6. Влияние состава элюента на характер элюции эритромицина с молекулярно импринтированного сорбента БДМ-10.

При использовании в качестве элюента фосфатного буфера с рН 9,2 для десорбции эритромицина с молекулярно импринтированного сорбента БДМ-10 наблюдался единственный широкий пик, характерный для одновременного нарушения полифункциональных взаимодействий.

Применение вытеснителя приводило к разделению пика. При увеличении концентрации вытеснителя наблюдались три пика, характерные для нарушения слабых и сильных взаимодействий молекул антибиотика с местами связывания, расположенными близко к поверхности и внутри зерна полимера. При этом выход эритромицина составил 100%.

В табл. 3 представлены условия десорбции эритромицина с исследуемых сорбентов в динамических условиях.

Табл. 3. Условия десорбции эритромицина с синтезированных сорбентов.

Наименование сорбента	Сорбция		Десорбция	
	рН	т, мг/г	Элюат	% выхода антибиотика
БДМ-0	5,35	50	0,2М фосфатный буфер рН	60
			0,2М водн. р-р CaCl ₂	30
			0,4М водн. р-р CaCl ₂	70
БДМ-5	5,35	90	0,2М фосфатный буфер рН	50
			0,2М водн. р-р CaCl ₂	50
			0,4М водн. р-р CaCl ₂	70
БДМ-10	5,35	80	0,2М фосфатный буфер рН	60
			0,2М водн. р-р CaCl ₂	70
			0,4М водн. р-р CaCl ₂	100

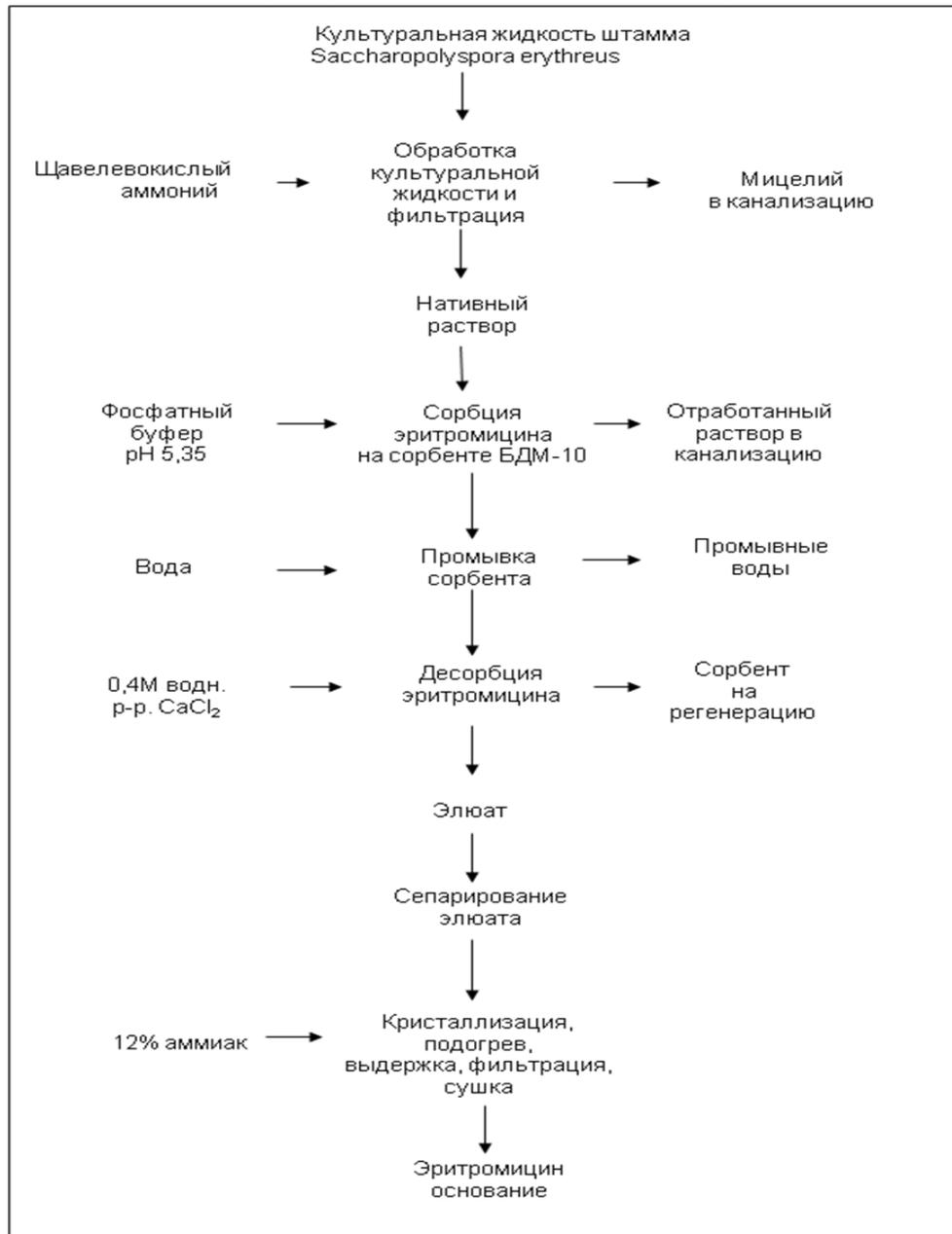
Таким образом, достигалась полная десорбция антибиотика с молекулярно импринтированного полимерного сорбента БДМ-10 в физико-химических условиях, позволяющих сохранить биологическую активность и нативную структуру молекулы эритромицина.

Лабораторная схема выделения эритромицина из нативного раствора *Saccharopolyspora erythreus*.

На основании проведенного систематического изучения межмолекулярных взаимодействий эритромицина с полимерными сорбентами разработана

лабораторная схема сорбционного выделения антибиотика с использованием молекулярно импринтированного сорбента БДМ-10 (рис. 7).

Рис. 7. Лабораторная схема выделения эритромицина.



Масштабирование одноактного препаративного хроматографического метода выделения антибактериального антибиотика эритромицина из нативного раствора.

Масштабирование динамических сорбционных процессов выделения необходимо для перехода к крупномасштабному получению антибиотика при оптимальных физико-химических условиях сорбции-десорбции. Для этого был рассчитан критерий регулярности динамического режима сорбции (λ_i).

$$\lambda_i = \frac{12\phi}{1+\phi} \Gamma_i \overline{D}_i d^{-2} \omega^{-1},$$

где ϕ – фазовое отношение хроматографической колонки;

Γ_i – равновесный коэффициент распределения i -го компонента между подвижной и неподвижной фазами;

\overline{D}_i – эффективный коэффициент диффузии i -го компонента, см²/с;

d – диаметр набухших частиц, см;

ω – приведенная скорость подвижной фазы, с⁻¹.

$$\phi = \frac{1-\alpha}{\alpha},$$

где α – доля свободного объема колонки.

Для карбоксильных катионитов доля свободного объема составляет ~ 30% от всего объема колонки, таким образом $\phi \approx 2,3$.

$$\omega = \frac{v}{V},$$

где v – скорость протекания подвижной фазы по колонке, мл/мин;

V – объем раствора, мл.

Значения $\lambda < 1$ соответствует нерегулярному режиму динамики сорбции. В этом случае происходит смещение точки перегиба (дифференциальный эффект нерегулярности режима) и уменьшение степени насыщения колонки сорбтивом (интегральный эффект нерегулярности режима). При значении $\lambda > 1$ динамический сорбционный процесс реализуется в регулярном режиме, когда точки перегиба фронтальной хроматографической кривой практически не зависят от скорости потока. При изменении параметров сорбционной системы внутри пределов, ограничивающих регулярный режим, не произойдет существенного изменения режима работы сорбционной колонны при переходе к промышленному масштабу производства. Таким образом, основным требованием масштабирования процесса является соблюдение регулярного режима сорбции.

В качестве сорбента для проведения масштабирования был выбран молекулярно импринтированный полимерный катионит БДМ-10, который обладает достаточной равновесной емкостью сорбции и способен полностью десорбировать

эритромицин в мягких условиях. Экспериментальные данные масштабировались экстраполяцией на промышленные колонки объемом 5, 10 и 100 литров. Концентрация эритромицина в нативном растворе составляла 2,5 г/л.

В табл. 4 представлены значения объемов и скоростей нативного и элюирующего раствора, которые нужно взять для вышеуказанных препаративных колонок. При указанной скорости сорбции критерий регулярности намного больше 1 ($\lambda=295$), следовательно, сорбционный процесс в таких условиях происходит в регулярном режиме.

Табл. 4. Масштабированные характеристики одноактного динамического процесса сорбции эритромицина на настроенном полимерном сорбенте БДМ-10.

$V_{кол.}, л$	$v_{сорб.}, л/ч$	$v_{дес.}, л/ч$	$V_{н.р.}, л$	$V_{дес.}, л$	$t_{сорб.}, ч$	$t_{десорб.}, ч$
0.004	0,015	0.015	0,08	0,04	5,3	2,7
5	19	19	80	40	4,2	2,1
10	31	31	160	80	5,2	2,6
100	143	143	1590	795	11,1	5,6

$V_{кол.}$ – объем колонки, л; $v_{сорб.}$ – скорость сорбции, л/ч; $v_{дес.}$ – скорость десорбции, л/ч; $V_{н.р.}$ – объем нативного раствора, л; $V_{дес.}$ – объем десорбирующего раствора, л; $t_{сорб.}$ – время сорбции, ч; $t_{десорб.}$ – время десорбции, ч.

Выводы

1. Впервые радикальной сополимеризацией метакриловой кислоты, метакрилата эритромицина и диметакрилата этиленгликоля синтезирован систематический ряд селективных молекулярно импринтированных сорбентов обладающих сорбционными центрами близкими по структуре биологическим рецепторам эритромицина. Определены электрохимические и физико-химические свойства синтезированных сорбентов.
2. Показано, что молекулярно импринтированные карбоксильные катиониты наиболее селективно и полифункционально связываются с эритромицином и

могут быть использованы для моделирования межмолекулярных взаимодействий эритромицина с пептидилтрансферазным центром 50S субъединицы рибосомы.

3. Изучение равновесия и кинетики сорбции эритромицина импринтированными сорбентами свидетельствует о преимущественно электростатических и гидрофобных межмолекулярных взаимодействиях антибиотика с полимерными сетками.

4. Наиболее эффективным полимерным сорбентом для разработки сорбционного процесса выделения и очистки эритромицина является молекулярно импринтированный катионит БДМ-10. Определены оптимальные физико-химические условия сорбции-десорбции эритромицина, обеспечивающие высокий выход антибиотика с сохранением его нативной структуры.

5. На основании изучения межмолекулярных взаимодействий в системе «эритромицин – молекулярно импринтированный сорбент» разработана схема выделения антибиотика из нативного раствора с использованием синтезированных сорбентов. При помощи безразмерного критерия λ проведен расчет параметров масштабирования одноактного динамического хроматографического процесса получения антибиотика.

Список опубликованных работ по теме диссертации.

1. Ezhova N.M., Garcushina I.S., Toshchevikova A.Y., Polyakova, I.V., Pisarev O.A. The new approach to constructing of the grain network polymers with ionogenic groups on surface layer // 4-th International Symposium “Molecular Order and Mobility in Polymer Systems”. – St.Petersburg, 2002. – P.232.
2. Ezhova N.M., Pisarev O.A., Garcushina I.S. The New Chromatographic Supports With Ionogenic Groups on Surfase Layer // 3rd Int.Symposium on Separations in BioSciences ”100 Years of Chromatography”. – SBS Moscow, 2003. – P.240.
3. Гаркушина И.С., Ежова Н.М., Тощевикова А.Ю., Писарев О.А. Особенности взаимодействия эритромицина с сетчатыми полиэлектролитами различной структуры // 10 Всероссийская конференция «Структура и динамика молекулярных систем». Тезисы докладов. – Яльчик, – 2003. – С.76.
4. Гаркушина И.С., Ежова Н.М., Тощевикова А.Ю., Писарев О.А. Особенности взаимодействия эритромицина с сетчатыми полиэлектролитами различной

структуры // Сб. статей «Структура и динамика молекулярных систем». Т. 2. – Яльчик, 2003. – С.202-205.

5. Garkushina I.S., Ezhova N.M., Pisarev O.A. Synthesis of the new type of the chromatographic polymer carriers “fitted” to the target object // International Symposium on Preparative and Industrial Chromatography and Allied Techniques. – Aachen, 2004. – P.114.

6. Garkushina I.S., Ezhova N.M., Pisarev O.A. A New Approach to the Synthesis of the Polymer Sorbents with High Sorption Selectivity to the Target Object //5-th International Symposium “Molecular Order and Mobility in Polymer Systems”. – St.Petersburg, 2005. – P.108.

7. Гаркушина И.С., Писарев О.А. Равновесие сорбции эритромицина на полимерных сорбентах различной структурной организации // Материалы Всероссийской межвузовской научно-технической конференции СПбГПУ. – Санкт–Петербург, 2005. – С. 183.

8. Гаркушина И.С., Ежова Н.М., Писарев О.А. Влияние структуры биосорбента на равновесные и кинетические параметры сорбции эритромицина А // Прикладная биохимия и микробиология. Т. 42. – Москва, 2006. – №4. – С.409-412.

9. Гаркушина И.С., Ежова Н.М., Писарев О.А. Новые подходы к конструированию сорбционных материалов целевого назначения // 2-я Санкт-Петербургская конференция молодых ученых с международным участием «Современные проблемы науки о полимерах». – Санкт-Петербург, 2006. – С.103.

10. Гаркушина И.С., Ежова Н.М., Писарев О.А. Анализ возможностей конструирования настроенных на целевой объект биосорбентов путем синтеза и полимеризации соответствующей матрицы // Сб. статей «Сорбенты как фактор жизни и здоровья». – Белгород, 2006. – С.59-61.

11. Гаркушина, И.С. Синтез и свойства полимерных сорбентов, «настроенных» на молекулу эритромицина // 3-я Санкт-Петербургская конференция молодых ученых с международным участием «Современные проблемы науки о полимерах». – Санкт-Петербург, 2007. – С.352.

12. Гаркушина И.С., Писарев О.А. Динамика сорбции эритромицина на карбоксильных катионитах. // Материалы Всероссийской Межвузовской научно-технической конференции. СПбГПУ. – С.-Петербург – 2007. – С.211.

13. Гаркушина И.С. Imprinted with molecule of erythromycin // 4-я Санкт-Петербургская конференция молодых ученых с международным участием «Современные проблемы науки о полимерах». – Санкт-Петербург, 2008. – С.117.
14. Ezhova N.M., Garkushina I.S., Pisarev O.A. Equilibrium and kinetics of erythromycin sorption on imprinted polymer beads // 27-th International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides. – Baden-Baden, 2008. – P.75.
15. Гаркушина И.С., Ежова Н.М., Писарев О.А. Сравнительное изучение сорбции эритромицина на поверхностно-активных и молекулярно импринтированных сорбентах // Сб. статей ”Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья”. – Белгород, 2008. – С.97-99.
16. Гаркушина И.С., Ежова Н.М., Писарев О.А. Взаимодействие эритромицина с карбоксильными полимерными сорбентами // Материалы международной научно-практической конференции. XXXVII неделя науки СПбГПУ. – Санкт-Петербург, 2008. – С.55-57.
17. Писарев О.А., Ежова Н.М., Гаркушина И.С. Взаимодействие эритромицина с полимерными сорбентами, «настроенными» на молекулу антибиотика // Журнал физической химии. Т. 83. – Москва, 2009. – №1. – С.142-147.
18. Гаркушина И.С., Ежова Н.М., Писарев О.А. Влияние заряда матрицы сшитого полиэлектролита на кинетику сорбции эритромицина // Материалы международной научно-практической конференции. XXXVIII неделя науки СПбГПУ. – Санкт-Петербург, 2009. – С.39-40.