

На правах рукописи

ПОЛЯКОВА ИРИНА ВАЛЕРИЕВНА

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СИСТЕМЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ  
АНТИБИОТИК ЭРЕМОМИЦИН - ПОЛИМЕРНЫЕ СОРБЕНТЫ**

03.00.02 – биофизика

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2004

Работа выполнена в Санкт-Петербургском политехническом университете на факультете медицинской физики и биоинженерии

Научный руководитель:

кандидат химических наук, ст. н. с. Писарев О.А.

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук, ст. н. с. Тимковский А.Л.

кандидат химических наук, доцент Глазова Н.В.

Ведущая организация:

Научно-исследовательский технологический институт антибиотиков и ферментов медицинского назначения

Защита состоится « 10 » июня 2004 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д. 212. 229. 25 при Санкт-Петербургском государственном политехническом университете по адресу: ул.Хлопина, 5 Санкт-Петербургский политехнический университет, факультет медицинской физики и биоинженерии.

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

Автореферат диссертации разослан « 7 » мая 2004г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат физико-математических наук, доцент

Власова О.Л.

**Актуальность темы.** Совершенствование лечебно-диагностических процессов является наиболее актуальной задачей в области медицинских наук. Решение данной задачи связано с использованием высокоэффективных лекарственных средств, к числу которых относятся антибиотики нового поколения. В настоящее время они являются важнейшими противоопухолевыми и антибактериальными средствами, широко используемыми в практической медицине.

Антибактериальный антибиотик эремомицин – новый представитель группы полициклических гликопептидов, для которой характерна высокая бактерицидная активность в отношении грамположительных бактерий, а также медленная адаптация к ним микроорганизмов. Являясь структурным аналогом известного антибактериального антибиотика ванкомицина, эремомицин по химиотерапевтическим свойствам превосходит его в 2-10 раз, и, одновременно, менее токсичен. Связывание эремомицина с бактериальной клеткой представляют собой сложный спектр физико-химических сорбционных взаимодействий цвиттериона антибиотика с пептидогликаном бактериальной клетки. Аминосахара инициируют первичное связывание и участвуют в формировании гидрофобного кармана, ингибирующего рост бактериальной клетки. Кроме того, углеводы значительно улучшают растворимость эремомицина в воде. Атом хлора в N-концевой части гептапептида стабилизирует этот участок и способствует прочности комплекса антибиотик – фрагмент D-Ala-D-Ala пептидогликана микробной клетки. Исследование химиотерапевтической эффективности продуктов деградации эремомицина показало, что дегликозилирование эремомицина и элиминирование атома хлора приводят к значительному снижению антимикробной активности антибиотика.

В настоящее время в основе технологии получения эремомицина лежит биосинтез с последующей многостадийной экстракционной очисткой с использованием органических растворителей. При этом наблюдается разрушение нативной структуры лекарственной субстанции, что приводит к ухудшению фармакологических свойств эремомицина.

Поэтому создание щадящей технологии получения и очистки эремомицина, максимально сохраняющего свою нативную структуру и, следовательно, обладающего высокой химиотерапевтической эффективностью, является актуальной задачей. Данная задача связана с систематическим изучением закономерностей физико-химического поведения органического цвиттериона эремомицина в модельных сорбционных системах, а также с экспериментальным выбором характеристик последних по

принципу их подобия природным сорбционным системам – клеточным стенкам бактерий.

**Цели и задачи исследования.** Целью работы являлось изучение закономерностей равновесия, кинетики и динамики межмолекулярных взаимодействий в модельных сорбционных системах с участием антибактериального антибиотика эремомицина и полимерных сорбентов и разработка на этой основе физико-химических условий осуществления эффективного хроматографического метода получения антибиотика с высокой нативной антибактериальной активностью.

Для реализации указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследование закономерностей межмолекулярного взаимодействия в системе антибактериальный антибиотик эремомицин - полимерные сорбенты различного типа и структуры на основе представлений о физико-химических взаимодействиях антибиотика с пептидогликаном бактериальной клетки.
2. Изучение равновесных и кинетических параметров сорбции эремомицина с полимерными сорбентами в условиях, при которых реализуется полифункциональные взаимодействия, обеспечиваемые нативной структурой антибиотика. Исследование физико-химических условий специфического равновесного межфазного переноса эремомицина в растворе биополимеров и его зависимости от кинетического фактора.
3. Исследование динамики межмолекулярного взаимодействия эремомицина с карбоксильными катионитами. Определение оптимальных физико-химических условий образования резких границ концентрационного профиля антибиотика.
4. Разработка физико-химических условий одноактного высокоселективного препаративного динамического процесса выделения эремомицина, при котором сохраняется его нативная структура. Расчет параметров масштабирования.

**Научная новизна.** На основе представлений о межмолекулярных взаимодействиях антибактериального антибиотика эремомицина с пептидогликаном грамположительных бактерий выявлены закономерности полифункционального связывания антибиотика с полимерными сорбентами различного типа и структуры и установлен превалирующий вклад электростатических и гидрофобных сил взаимодействия. Установлено, что карбоксильные гетеросетчатые полиэлектролитные системы, являющиеся структурно устойчивыми при изменении степени ионизации фиксированных групп и ионной силы окружающего раствора, способствуют наиболее полному связыванию цвиттериона эремомицина. В совокупности эти свойства позволяют сравнивать карбоксильные полимерные сорбенты с биологическими

мембранами, особенно клеточной стенкой бактерий, и, следовательно, использовать их в моделировании биологических сорбционных систем.

Впервые изучены равновесные, кинетические и динамические закономерности межмолекулярного взаимодействия эремомицина с полимерными сорбентами. Установлен внутридиффузионный характер инклюзии эремомицина в структуру полимерных сорбентов и природа распределения антибиотика в зернах катионитов, соответствующая теоретической модели «оболочка-ядро». Исследованы условия обострения концентрационного профиля в регулярном динамическом режиме взаимодействия эремомицина с карбоксильными катионитами и механизм перераспределения вкладов сил межмолекулярного взаимодействия в системе сорбат – сорбтив.

**Практическая значимость.** На основании проведенных исследований и теоретической обработки полученных экспериментальных данных по равновесию, кинетике и динамике межмолекулярного взаимодействия эремомицина с полимерными сорбентами различной молекулярной структуры установлены оптимальные физико-химические условия реализации эффективного динамического процесса получения лекарственной субстанции антибиотика, сохраняющей свою нативную структуру и высокую антибактериальную активность. Проведено масштабирование параметров эффективного одноактного высокоселективного препаративного хроматографического метода получения эремомицина. Установлена целесообразность использования карбоксильных катионитов в процессе моделирования биологических сорбционных систем.

**Апробация работы.** Основные результаты исследований были представлены на межвузовской научной конференции «XXIX неделя науки СПбГТУ» (Санкт-Петербург, 2000, 2001), на 10-ой международной конференции студентов и аспирантов «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений» (Вторые Кирпичниковские чтения, Казань, 2001), на Втором конгрессе молодых ученых «Научная молодежь на пороге XXI века» (Томск, 2001), на 25-ой Международной конференции по высокоэффективным жидкофазным разделениям (Голландия, 2001), на Международном симпозиуме по ионному обмену и хроматографии (Воронеж, 2001), на научно-практической конференции «Формирование технической политики инновационных наукоемких технологий» (Санкт-Петербург, 2001, 2003), на Международной конференции по препаративной и промышленной хроматографии «SPICA 2002» (Heidelberg, 2002), на Всесоюзных

симпозиумах “Структура и динамика молекулярных систем” (Яльчик 2002, 2003г), на 3-ем Международном симпозиуме по разделениям в бионауках (Москва, 2003).

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Закономерности и основные виды межмолекулярных взаимодействий в системе антибактериальный антибиотик эремомицин - полимерные сорбенты различной молекулярной структуры на основе представлений о связывании антибиотика с бактериальной клеткой. Анализ равновесно-кинетических параметров и особенности поглощения полимерными сорбентами органического цвиттериона эремомицина.
2. Оценка динамических параметров взаимодействия эремомицина с полимерными сорбентами различной молекулярной структуры с целью разработки эффективного метода получения лекарственной субстанции с сохранением ее нативной структуры.
3. Расчет параметров масштабирования одноактного высокоселективного препаративного хроматографического процесса получения эремомицина.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 14 работ.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, полученных экспериментальных данных, а также их математической обработки, выводов, списка литературы, включающего 123 работы отечественных и зарубежных авторов. Работа изложена на 115 страницах, содержит 28 рисунков и 10 таблиц.

**Материалы и методы.**

Основным объектом исследования являлся *эремомицин* - антибактериальный антибиотик, выделенный во ВНИИ по изысканию новых антибиотиков АМН СССР из культуральной жидкости актиномицета ИНА-238. По своей структуре эремомицин относится к группе полициклических гликопептидов (далбагептидов). Эта группа объединяет антибиотики, в которых углеводы связаны с линейным гептапептидом, включающим трифенокситриаминотрикарбоновую (ванкомициновую) и дифенилдиаминодикарбоновую кислоты, что придает антибиотикам характерную полициклическую структуру. Молекулярная масса эремомицина ( $C_{73}H_{89}N_{10}O_{20}Cl$ ) - 1540. В своей структуре эремомицин содержит ионогенные группы: концевую карбоксильную ( $pK_{\alpha}$  3.1), три аминных ( $pK^1_{\alpha 1}$  6.9,  $pK^2_{\alpha 1}$  7.9,  $pK^3_{\alpha 1}$  9.0) и три фенильных ( $pK^1_{\alpha 2}$  9.7,  $pK^2_{\alpha 2}$  10.4,  $pK^3_{\alpha 2}$  11.35).

В качестве полимерных сорбентов использовались: полисорб (неионогенный макропористый сорбент – сополимер стирола и дивинилбензола); полидекстран – Т70 (продукт взаимодействия растворимого декстрана с эпихлоргидрином); «Сферон» –

сополимер метакриловой кислоты и глицидилметакрилата, синтезированный в Институте Макромолекулярной Химии ЧАН; АВ-17×8 - высокоосновный анионит на основе сополимера стирола и дивинилбензола; катиониты группы БДМ, полученные в ИВС РАН путем радикальной сополимеризации метакриловой кислоты (МАК) и диметакрилата этиленгликоля (ДМЭГ); сорбенты MN-200 и MN-500 (сульфированные изопористые сополимеры стирола и дивинилбензола, полученные в присутствии циклогексана как порообразователя. Синтезированы в ИНЭОС РАН).

Потенциометрическое титрование сорбентов проводили методом отдельных навесок, предложенным Грегором. В основу метода положено эмпирическое уравнение Гендерсона-Гассельбаха:

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

где  $\text{pK}_\alpha$  – кажущаяся константа диссоциации функциональных групп сорбента,  $\alpha$  – степень ионизации функциональных групп,  $n$  – константа, зависящая от строения полимерной матрицы и природы противоиона. По физическому смыслу величина  $n$  представляет собой меру отклонения системы от идеальности при ионизации полиэлектролита.

Равновесные и кинетические параметры сорбции эремомицина были исследованы в статических условиях спектрофотометрическим методом, основанным на способности эремомицина поглощать ультрафиолетовый свет с максимумом поглощения при  $\lambda = 280$  нм. Для определения равновесной концентрации антибиотика использовали предварительно построенные калибровочные кривые  $D_{280\text{нм}} = f(C)$ , которые носили линейный характер вплоть до  $C=0.3$  мг/мл. Сорбционную емкость сорбента по антибиотику находили по формуле:

$$m = \frac{(C - C_{\text{равн}}) \cdot V}{m_n} \cdot 1000 \quad (2)$$

где  $C$ ,  $C_{\text{равн}}$  – начальная и равновесная концентрации эремомицина соответственно, мг·мл<sup>-1</sup>;  $V$  – объем раствора, мл;  $m_n$  – масса навески сорбента, г.

Математическая обработка экспериментальных данных по кинетике взаимодействия эремомицина с сорбентами производилась:

1. по модели Бойда:

$$\bar{D} = 0.087 \text{tg}^2 \beta R^2 \quad (3)$$

где  $\bar{D}$  – эффективный коэффициент диффузии, см<sup>2</sup>/с;  $R$  – радиус зерна ионита в набухшем состоянии, мкм;  $\beta$  – угол наклона линейного участка зависимости  $F = f(\sqrt{t})$ ;  $F = m_t / m_\infty$  - степень достижения равновесия сорбции за время  $t$ .

Среднее время сорбции рассчитывали следующим образом:

$$\bar{t} = \int_0^1 t(\partial F/\partial t)dt = \int_0^1 t dF \quad (4)$$

В случае внутридиффузионной кинетики в сферическое зерно сорбента:

$$\bar{t} = \frac{R^2}{15\bar{D}}; \quad (5)$$

2. по модели “оболочка-ядро”:

$$F = \frac{1}{L} \frac{6}{\left[3 - \frac{L}{R} \left(3 - \frac{L}{R}\right)\right]} \sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \quad (6)$$

$$\bar{t} = L^2(1+3\rho + 6\rho^2 + 5\rho^3)/15\bar{D}(1 + \rho + \rho^2). \quad (7)$$

$$\rho = \frac{R-L}{R}, \quad (8)$$

где L – эффективный сорбционный слой, мкм;  $\rho$  - относительный радиус.

Динамику взаимодействия эремомицина с карбоксильными катионитами группы БДМ исследовали на лабораторных колонках различных размеров. Исследовали влияние скорости подачи раствора эремомицина и десорбирующего раствора на характер динамических режимов взаимодействия антибиотика с сорбентом.

## **Результаты и их обсуждение.**

### *Равновесие взаимодействия эремомицина с полимерными сорбентами*

Изучение равновесия взаимодействия биологически активных молекул и полимерных сорбентов различного типа и структуры позволяет более подробно интерпретировать природу поведения этих молекул в сложных биологических системах. На рисунке 1а. показано взаимодействие карбоксильных катионитов группы БДМ с цвиттерионом эремомицина. В данной сорбционной системе прослеживается связь между емкостью сорбции, с одной стороны, и количеством мостикообразующего агента в ионите или набухаемостью, с другой стороны. Наличие сорбционной емкости в кислой среде (при pH ~3.5), в которой карбоксильные группы катионитов практически недиссоциированы, свидетельствует о необменном, скорее всего, гидрофобном взаимодействии антибиотика с сорбентами, причем величина сорбционной емкости падает с понижением коэффициента набухания. Восходящий участок кривых соответствует постепенному переходу катионитов в диссоциированное состояние, при котором они вступают в электрвалентное взаимодействие с ионами и ассоциатами эремомицина. Максимальное значение сорбционной емкости по



эремомицину достигается в области значений рН, близких к нейтральным. При этом, в зависимости от количества сшивающего агента, наблюдается смещение максимума сорбции: от слабокислых рН для структурно гелевых сорбентов (БДМ-1 и БДМ-3) к нейтральным рН для структурно сегрегированных сорбентов (БДМ-9 и БДМ-12). Понижение сорбционной емкости до нуля в сильно щелочной области рН дает основание полагать, что специфика взаимодействия эремомицина с карбоксильными катионитами на нисходящем участке кривых определяется переходом амино- и фенильных групп антибиотика в недиссоциированное состояние.

Исследование физико-химических свойств карбоксильных катионитов группы БДМ показало, что в зависимости от степени сшивки в водных растворах эффективная константа диссоциации сорбентов имеет порядок величины  $10^{-5} \div 10^{-7}$ .

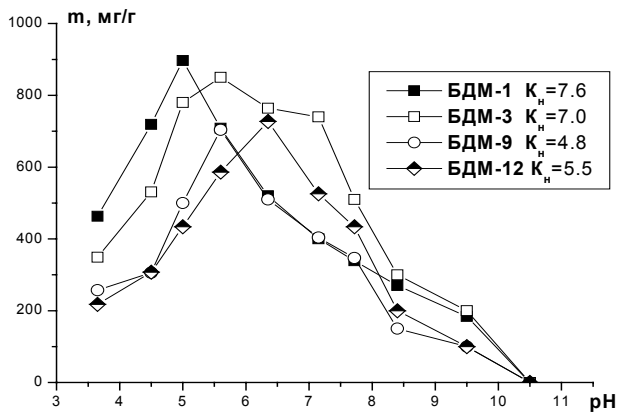


Рис.1а. Сорбция эремомицина на карбоксильных катионитах группы БДМ с разной степенью сшивки в зависимости от рН внешнего раствора.  $m$  – сорбционная емкость по эремомицину. Цифра в названии сорбента соответствует содержанию сшивающего агента ДМЭГ в мольных %.

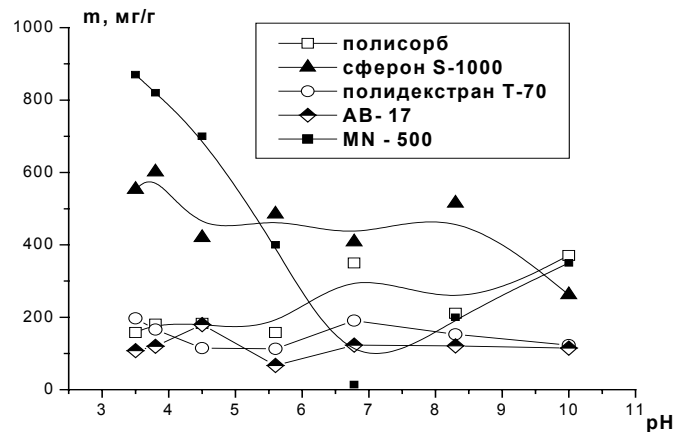


Рис.1б. Влияние рН на сорбцию эремомицина сорбентами с различной молекулярной структурой.

Достаточно прямолинейный характер кривых на рис. 1б, характеризующих постоянство величин сорбционных емкостей полидекстрана и анионита АВ-17 в отношении эремомицина при различных значениях рН, указывает на необменное гидрофобное взаимодействие эремомицина с данными сорбентами. С молекулярными сорбентами «Сфероном» и «Полисорбом» эремомицин также вступает в гидрофобные взаимодействия за счет ярко выраженной агликоновой (циклопептидной) части

молекулы, которая формирует гидрофобный карман в результате связывания антибиотика с пептидогликаном бактериальной клетки.

Иная картина наблюдается при сорбции эремомицина на сульфокатионите MN-500. Поскольку энергия отрыва иона водорода в сульфогруппах значительно меньше, чем в карбоксильных группах, а диссоциация сульфогрупп существенно не зависит от концентрации ионов водорода в широком интервале значений pH, то уже при pH ~3.5 наблюдается высокая сорбционная емкость. Понижение величины сорбционной емкости в нейтральной области pH, по всей видимости, обусловлено ограничением проницаемости внутрисетчатого пространства изопористого сульфокатионита по отношению к ассоциатам эремомицина и усугубляется электростатическим отталкиванием ионизированной карбоксильной группы антибиотика от сульфогрупп. Рост pH в сторону щелочных значений способствует переходу основных групп антибиотика в неионизированное состояние и понижению ассоциатообразования. Это выражается в росте сорбционной емкости в результате превалирования преимущественно гидрофобного взаимодействия над электростатическим.

Большинство клеток отрицательно заряжено по отношению к внешней среде. Кроме того, в молекулярную структуру муреина (пептидогликана бактериальной клетки) входят карбоксильные группировки, вступающие не только в ион-ионные взаимодействия с биологическими молекулами, но также индуцирующие дипольный момент в незаряженных молекулярных структурах. Это позволяет взаимодействовать физиологически активным субстанциям в биологических сорбционных системах по сложному полифункциональному механизму. Изучение взаимодействия эремомицина с карбоксильными катионитами продемонстрировало первичное электровалентное связывание аминогрупп антибиотика и дальнейшую реализацию полифункциональных взаимодействий в модельной системе. Необходимо отметить, что первичное связывание эремомицина с муреином также инициируют аminosахара антибиотика, а дальнейшее взаимодействие гидрофобного агликонового фрагмента молекулы эремомицина со стенкой бактериальной клетки способствует образованию гидрофобного кармана.

Варьирование физико-химических условий позволяет более подробно интерпретировать виды взаимодействия в сорбционной системе.

С ростом ионной силы при постоянной концентрации антибиотика во внешнем растворе, равной  $1.0 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ , выбранной с учетом содержания эремомицина в культуральной жидкости, наблюдается уменьшение сорбционной емкости, т.к. подавляется диссоциация ионогенных групп антибиотика (см. табл.1). Введение

органического растворителя, прежде всего, способствует подавлению гидрофобных взаимодействий. Также понижается диэлектрическая постоянная раствора, а следовательно понижается подвижность диссоциированных ионов и молекул. В исследуемой сорбционной модели наблюдается экстремальная зависимость емкости сорбции от количества органического растворителя во внешнем растворе. Протекание сорбции в статических условиях при достаточно больших концентрациях изопропанола свидетельствует о сверхэквивалентной сорбции антибиотика.

Таблица 1.

**Влияние различных факторов на сорбцию эремомицина на карбоксильных катионитах с разным содержанием сшивающего агента**

Факторы, влияющие на сорбцию		БДМ-5		БДМ-12	
		m, мг·г <sup>-1</sup>	B, %	m, мг·г <sup>-1</sup>	B, %
I, М (C=1 мг·мл <sup>-1</sup> )	0	975	97.5	936	95.5
	0.1	856	85.6	788	81.2
	0.2	460	60	392	62
	0.4	86	8.9	84	8.9
A, % (I=0.2M) C=1 мг·мл <sup>-1</sup> )	0	458	52.5	390	50.7
	10	595	54.3	600	60.6
	25	750	79.5	635	65.5
	50	156	16	618	61.2
	70	199	19	460	54

m - сорбционная емкость сорбента, мг·г<sup>-1</sup>; I – ионная сила внешнего раствора, М; C – концентрация эремомицина, мг·мл<sup>-1</sup>; A - процентное содержание изопропилового спирта во внешнем растворе; B – процент сорбированного эремомицина,  $B = \frac{m_{нач} - m_{равн}}{m_{нач}} \cdot 100\%$ , где m<sub>равн</sub> – масса эремомицина в равновесном растворе, мг; m<sub>нач</sub> – масса эремомицина в начальном растворе, мг.

Кинетика взаимодействия эремомицина с полимерными сорбентами.

Одним из основных факторов, влияющих на кинетику взаимодействия органических компонентов с сорбентом, является размер частиц сорбента. При уменьшении размера частиц кинетические кривые сорбции эремомицина катионитами группы БДМ (рис. 3) в координатах  $F=f(t^{1/2})$  показывают улучшение кинетических параметров: увеличение угла наклона начального участка, характеризующего скорость насыщения, tgβ, и времени полунасыщения t<sub>0,5</sub>, при котором F=0.5. Так измельчение ионитов до величины R~80 мкм увеличивает скорость диффузии практически на

порядок и более (см.табл.2). Одновременно с этим очевиден внутридиффузионный характер поглощения эремомицина, о чем свидетельствует достаточно протяженный начальный прямолинейный участок кинетических кривых в координатах  $F=f(t^{1/2})$ .

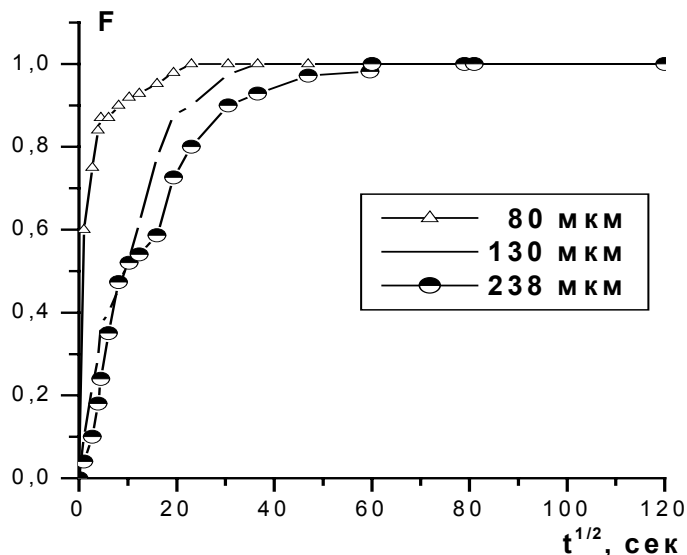


Рис.3. Влияние размеров частиц сорбента на кинетику взаимодействия эремомицина с БДМ-12. рН=6.9, I=0.2M; F – степень заполнения сорбента эремомицином; t – время, сек.

При равномерном распределении органических ионов в объеме частиц сорбента обработку кинетических экспериментальных данных традиционно осуществляют по модели Бойда. Рассчитанные в результате такой математической обработки параметры: эффективный коэффициент диффузии,  $\bar{D}$ , и среднее время сорбции,  $\bar{t}$ , не соответствуют полученной экспериментально закономерности, т.е., по расчетным данным не прослеживается наблюдаемое экспериментально улучшение кинетических параметров на фракциях частиц сорбентов среднего размера (130 ÷ 358 мкм) (см.табл.2). Это указывает на неравномерное распределение органического цвиттериона эремомицина в полимерных носителях, возникающее в результате диффузии, идущей внутри ограниченной глубины каналов или пустот, по которым движутся ионы от периферии зерна к центру. Такой характер диффузии приводит к постепенному затуханию процесса перемещения сорбируемых молекул. Поэтому для адекватной оценки кинетических экспериментальных данных была использована модель, учитывающая неоднородное распределение органических ионов в фазе сорбента – модель «оболочка – ядро».

**Кинетические параметры взаимодействия эремомицина с карбоксильными катионитами**

Сорбенты	$K_n$	Размер частиц, $R \cdot 10^4$ , см	Эксперимент. данные из кинетических кривых		Расчетные данные по модели Бойда		Расчетные данные по модели «оболочка-ядро»	
			$\text{tg } \beta$	$t_{0.5}$ , мин	$\bar{D} \cdot 10^8$ , $\text{см}^2 \cdot \text{сек}^{-1}$	$\bar{t}$ , мин	$\bar{D} \cdot 10^9$ , $\text{см}^2 \cdot \text{сек}^{-1}$	$\bar{t}$ , мин
БДМ-3	7.0	358	0.028	6.02	31.99	16.24	3.02	9.36
		130	0.043	1.60	9.98	6.89	6.34	4.19
		80	0.085	0.27	14.72	1.76	21.92	1.38
БДМ-5	6.2	238	0.026	10.83	11.31	18.84	2.34	11.01
		130	0.040	2.5	7.99	7.96	4.70	5.16
		80	0.072	1.07	9.80	2.46	14.60	1.92
БДМ-9	4.8	238	0.036	3.04	18.30	9.82	3.77	5.74
		130	0.043	1.36	7.79	6.90	4.93	4.20
		80	0.178	0.15	50.35	0.40	74.98	0.31
БДМ-12	5.5	238	0.034	2.80	17.81	11.00	3.64	6.44
		130	0.045	2.02	9.36	6.29	5.91	3.79
		80	0.227	0.10	89.67	0.25	133.5	0.19

Для расчетов кинетических параметров взаимодействия эремомицина с карбоксильными катионитами группы БДМ по модели «оболочка-ядро» была установлена толщина сорбционного слоя,  $L$ . Для этого были исследованы зависимости сорбционных емкостей ионитов БДМ-5 и БДМ-12 от среднего радиуса частиц. Максимальная сорбционная емкость как для гелевого БДМ-5, так и для гетеросетчатого сорбента БДМ-12 наблюдалась в практически одинаковом диапазоне размеров частиц (рис.4). Средний радиус 20 мкм был принят приближительной величиной сорбционного слоя  $L$ . При данной величине частиц исходная структура сорбента все еще сохраняется, и все типы взаимодействия эремомицина с катионитами реализуются. При дальнейшем измельчении сорбентов имеет место разрушение структуры сшитого полимера под воздействием механических сил, приводящее к ухудшению сорбционных параметров сорбентов. Величина сорбционной емкости катионитов с радиусом частиц  $\sim$  от 80 мкм и выше имеет практически постоянную величину, что в совокупности с хорошими механическими характеристиками среднedisперсных сорбентов делает их наиболее подходящими для осуществления препаративных хроматографических процессов.

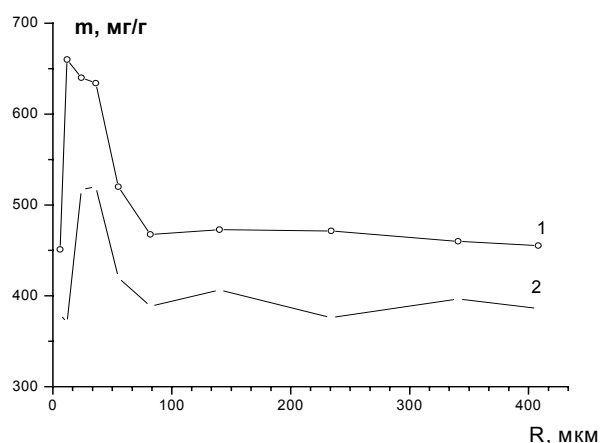


Рис. 4. Зависимость сорбционной емкости катионитов БДМ-5 (1) и БДМ-12 (2) по отношению к эремомицину от размера частиц сорбента (сорбция из 0.2М ац.-амм. буфера, рН=6.9).

Исследование кинетических параметров взаимодействия эремомицина с БДМ-12 в различных условиях протекания диффузии дало возможность дополнительно интерпретировать факторы, влияющие на неравномерное распределение антибиотика в объеме сорбента. Введение сильного электролита во внешний раствор частично подавляет электростатические взаимодействия между антибиотиком и катионитом, и, следовательно, отражает вклад молекулярного, с преобладанием гидрофобного, связывания в диффузионную миграцию органического цвиттериона. Колебательный характер кривых (рис. 5а.) на участке неравновесной сорбции с превышением степени насыщения  $F=1$  можно интерпретировать как доннановское исключение адсорбтива из сорбционной системы. При достижении сорбционного равновесия кривые носят прямолинейный характер. При подавлении электростатических взаимодействий эремомицина с БДМ-12 незначительное улучшение кинетических параметров наблюдалось на самой крупной фракции (238 мкм), поскольку в структуре сорбента удельное содержание гидрофобных компонентов больше, чем в более мелких фракциях.

При введении во внешний раствор изопропилового спирта (рис.5б) создаются условия подавления гидрофобных взаимодействий, одновременно с этим наблюдается преобладание ионообменной и молекулярной сорбции. Причем на самой крупной фракции (238 мкм) наблюдается значительное ухудшение кинетических параметров (эффективный коэффициент диффузии уменьшается практически на два порядка в

сравнении с более мелкими фракциями), по причине более затрудненного доступа к сорбционным центрам сорбента.

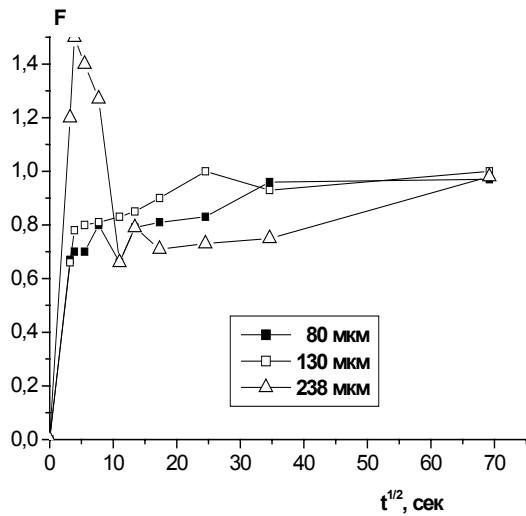


Рис.5а. Кинетика взаимодействия эремомицина с БДМ-12 с разным средним размером частиц из 0.2 М ац.-амм.буфера в присутствии 0.4 М NaCl при рН=6.9.

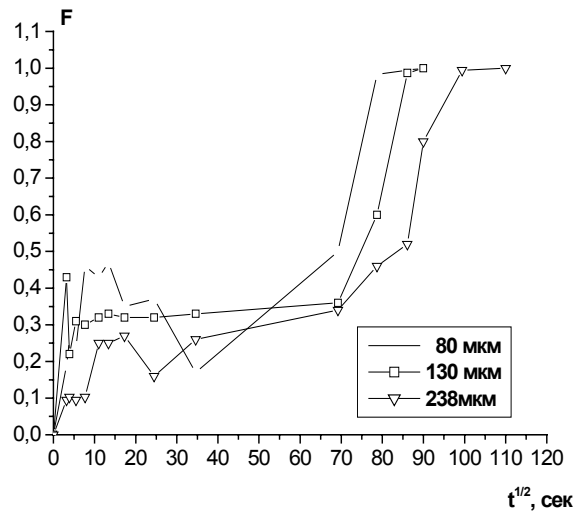


Рис.5б. Кинетика взаимодействия эремомицина с БДМ-12 из 50% раствора изопропанола в 0.2М ац.-амм. буфера при рН=6.9.

Таким образом, изучение кинетики взаимодействия продемонстрировало неоднородное распределение и полифункциональное связывание эремомицина на карбоксильных катионитах в зависимости от физико-химических условий сорбции.

#### Динамика взаимодействия эремомицина с карбоксильным катионитом БДМ-12

Исследование динамики межмолекулярного взаимодействия в модельных сорбционных системах необходимо для подробной интерпретации механизма квазиравновесного связывания, характерного для биологических сорбционных систем. Одновременно с этим, в ходе эффективных динамических процессов создаются условия для получения лекарственных субстанций, проявляющих наиболее эффективную химиотерапевтическую избирательность. Поэтому целью данного раздела работы являлась разработка схемы эффективного динамического процесса выделения эремомицина, сохраняющего свою нативную структуру. Для этого решалась одна из основных задач препаративной фронтальной динамической сорбции - исследование условий, при которых границы концентрационного профиля выделяемой физиологически активной субстанции не размываются, а динамический процесс протекает в регулярном режиме, обеспечивающем полноту полифункционального связывания.

Использование 0.2 М ацетатно-аммониевого буфера со щелочным рН в качестве десорбирующего раствора (в соответствии с равновесными экспериментами) позволило осуществить полную десорбцию эремомицина с карбоксильных катионитов. На рисунке 6 элюционные кривые демонстрируют постепенное обострение стационарного концентрационного фронта эремомицина по мере перехода рН элюирующего раствора в сторону более щелочных значений. При рН=10.5 наблюдается максимальное концентрирование.

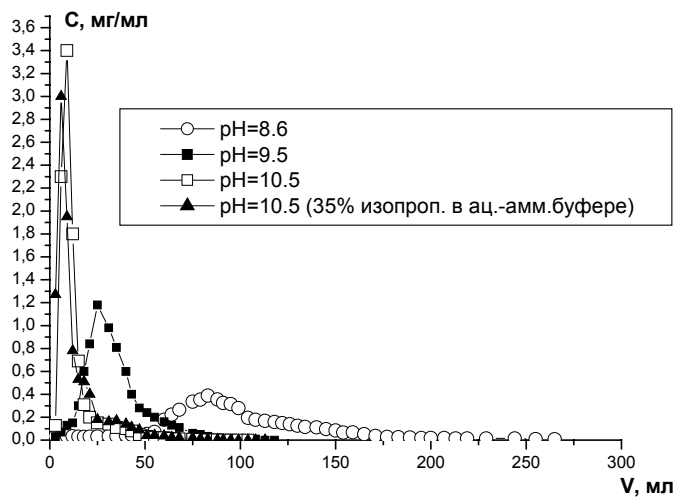


Рис. 6. Десорбция эремомицина с катионита БДМ-12. Элюент – 0.2М щелочной ацетатно-аммониевый буфер. Сорбция осуществлялась из 0.2М ац.-амм. буфера с рН=6.4 при начальной концентрации эремомицина 1 мг/мл. Скорость сорбции – десорбции 0.5 мл/мин; размер колонки D×H=10×70мм.

Осуществление эффективной динамики взаимодействия, при котором реализуется максимальное концентрирование физиологически активного компонента, зависит как от скорости протекания многокомпонентного раствора по колонке, так и от скорости протекания десорбирующего раствора. Понижение величины скоростей протекания растворов по колонке, как правило, способствует формированию стационарного концентрационного профиля.

Характер динамических кривых, изображенных на рисунке 7а, свидетельствует о формировании стационарного концентрационного профиля эремомицина при подаче раствора в колонку со скоростью порядка 0.2 мл/мин. Режим сорбции при скорости подачи раствора равной 3.5 мл/мин является неравновесным. Остальные динамические кривые соответствуют переходному режиму, близкому к равновесному.

Исследование влияния скорости десорбции эремомицина с катионита БДМ-12 на форму элюционных кривых (рис. 7б) свидетельствуют о протекании равновесной



десорбции в достаточно широком диапазоне скоростей, а при скоростях десорбции 0.3÷0.7 мл/мин происходит концентрирование антибиотика в 30÷40 раз, что является существенным при масштабировании процесса.

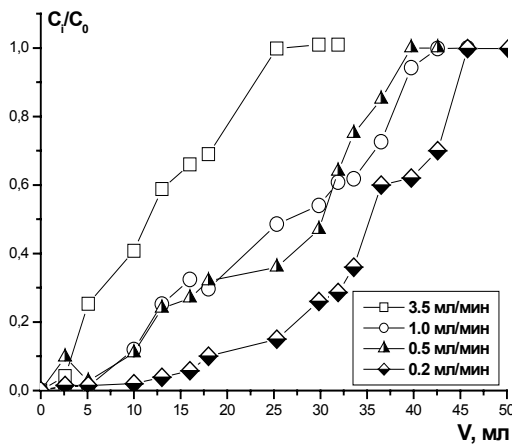


Рис.7а. Влияние скорости протекания раствора эремомицина на динамику взаимодействия эремомицина с БДМ-12. Сорбция из 0.2 М ац.-амм. буфера с pH=7.2; размер колонки D×H=10×70мм.

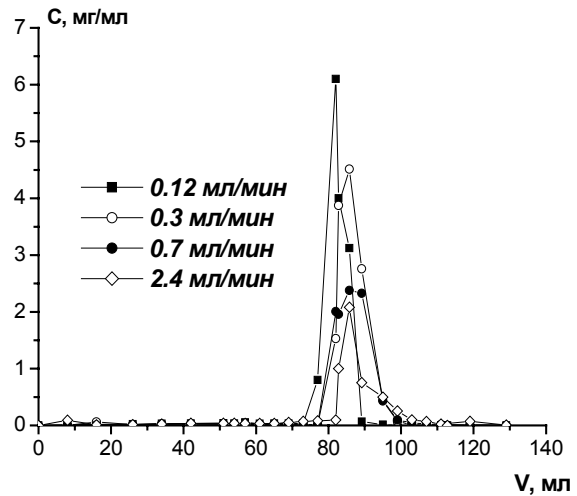


Рис.7б. Влияние скорости протекания десорбирующего раствора на режим элюции эремомицина с БДМ-12. Сорбция из 0.2 М ац.-амм. буфера при pH=7.2; элюент - 0.2 М ац.-амм. буфер с pH=10.5; размер колонки D×H=10×70мм.

Изменение ионной силы десорбирующего раствора способствует перераспределению вкладов сил межмолекулярного взаимодействия в системе сорбат-сорбтив. При этом может наблюдаться как уширение, так и раздвоение концентрационных профилей. На рис.8 показано влияние ионной силы и содержания органического компонента на форму концентрационного профиля, формирующегося при десорбции эремомицина с катионита БДМ-12. Очевидно, что вследствие уменьшения экранировки ионогенных центров, понижение ионной силы десорбирующего раствора способствует увеличению времени задержки органического иона. Введение 30% изопропилового спирта в 0.1 М ацетатно - аммониевый буфер способствует большему уширению пика и увеличению времени задержки на колонке. В динамических условиях введение 30% изопропанола в десорбирующий раствор (0.1М ацетатно-аммониевый буфер с pH=10.5) способствует удержанию эремомицина с катионитом по мере продвижения элюционного фронта по колонке и концентрационный фронт размывается. С ростом ионной силы от 0.1М до 0.2 М при десорбции щелочным ацетатно-аммониевым буфером все взаимодействия эремомицина с катионитом подавляются и формируется более узкий и высокий стационарный концентрационный профиль.

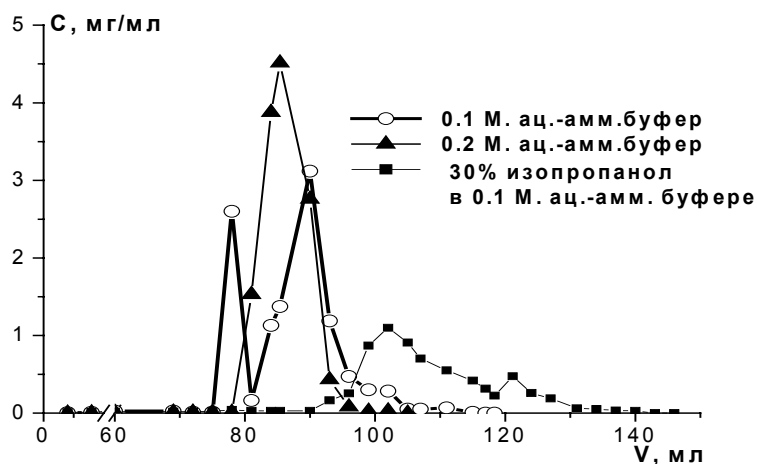


Рис. 8. Влияние ионной силы на динамику десорбции эремомоцина на БДМ-12. Сорбция протекала из 0.2 М ац.-амм. буфера при  $\text{pH}=7.2$ , с начальной концентрацией эремомоцина в растворе 1 мг/мл. Десорбция производилась щелочным ац.-амм. буфером с  $\text{pH}=10.5$  при различной ионной силе; размер колонки  $D \times H=10 \times 70$  мм.

Размер колонки, также является одним из основных факторов, влияющих на формирование границ элюционного фронта. В процессе сорбции эремомоцина на колонке малого размера  $D \times H=8 \text{ мм} \times 15 \text{ мм}$  был выявлен механизм динамического связывания антибиотика с катионитом.

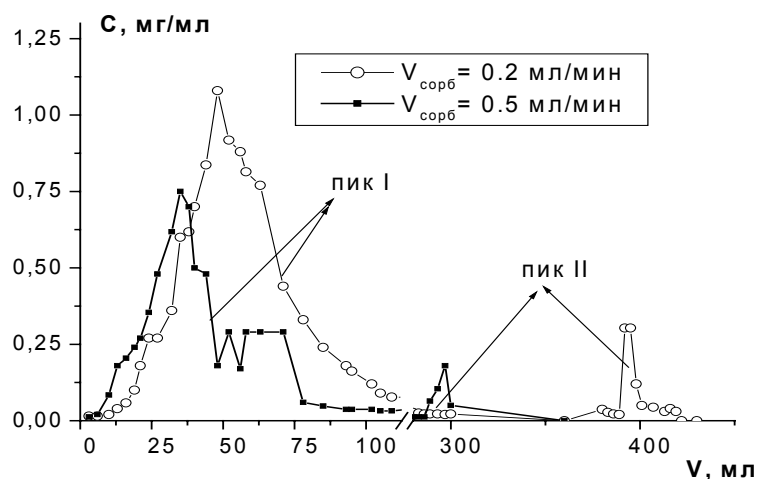


Рис. 9. Динамика взаимодействия эремомоцина с БДМ-12 на колонке  $D \times H=8 \text{ мм} \times 15 \text{ мм}$ ; сорбция осуществлялась из 0.2 М ац.-амм. буфера ( $\text{pH}=6.9$ ) при начальной концентрации эремомоцина в растворе 1 мг/мл; скорость десорбции  $V_{\text{десорб.}}=1$  мл/мин; пик I - элюция 0.2 М ац.-амм.буфер при  $\text{pH}=6.9$ , пик II - элюция 0.2 М ац.-амм.буфер при  $\text{pH}=10.5$ .

На рис. 9 широкие пики I, соответствуют десорбции антибиотика под воздействием 0.2 М буфера, из которого протекала сорбция. Выход эремомоцина составляет порядка  $85 \div 90\%$  от общей массы. Оставшийся антибиотик ( $10 \div 15\%$ ) десорбируется только при подавлении ион-ионных взаимодействий щелочным буфером

(пик II). Дробление пика I, скорее всего, объясняется тем, что при увеличении скорости сорбции до 0.5 мл/мин большее количество антибиотика задерживается непосредственно у выхода из колонки.

Таким образом, исследование динамики сорбции эремомицина на карбоксильном катионите БДМ-12 позволило детально исследовать условия формирования элюционного фронта и показало целесообразность использования этого катионита для разработки селективного хроматографического выделения эремомицина, сохраняющего свою нативную структуру и химиотерапевтическую эффективность.

Масштабирование процесса хроматографического выделения эремомицина.

Для реализации оптимальных физико-химических условий крупномасштабного получения физиологически активных субстанций в условиях производства проводят масштабирование динамических сорбционных процессов. С этой целью рассчитывают критериальный параметр  $\lambda_i$ , который характеризует режимы динамических процессов сорбции.

$$\lambda_i = \frac{12\phi}{1+\phi} \Gamma_i \bar{D}_i d^{-2} \omega^{-1}, \quad (9)$$

где  $\Gamma_i$  – равновесный коэффициент распределения  $i$ -того компонента;  $\bar{D}_i$ , ( $\text{см}^2 \cdot \text{сек}^{-1}$ ) - эффективный коэффициент диффузии  $i$ -того компонента;  $d$ , (см) – диаметр набухших частиц;  $\phi$  - фазовое отношение хроматографической колонки:

$$\phi = (1-\alpha)/\alpha, \quad (10)$$

где  $\alpha$  – доля свободного объема колонки, которая для карбоксильных катионитов группы БДМ составляет  $\approx 0.3$ , соответственно  $\phi \approx 2.3$ ;  $\omega$ , ( $\text{мин}^{-1}$ ) – приведенная скорость подвижной фазы:

$$\omega = v \cdot V^{-1}, \quad (11)$$

где  $V$  – объем раствора, мл;  $v$  - скорость протекания подвижной фазы по колонке, мл/мин.

При внутридиффузионной кинетике в ограниченный слой частиц сорбента условие регулярности режима имеет вид:

$$\Lambda_i = \lambda_i (1+\rho + \rho^2)/(1+3\rho + 6\rho^2+5\rho^3) \gg 1, \quad (12)$$

где  $\rho$  – относительный радиус несорбирующего “ядра”.

По полученным равновесным, кинетическим и динамическим параметрам взаимодействия эремомицина с катионитом БДМ-12 был рассчитан критерий  $\Lambda$ , демонстрирующий наличие регулярного режима протекания динамических процессов ( $\Lambda \gg 1$ ) в широком диапазоне скоростей подачи раствора в колонку. На основании полученных величин  $\Lambda$  были рассчитаны допустимые величины скоростей протекания подвижной фазы через колонки различных объемов (см. табл.3).

Таблица 3.

**Масштабированные параметры динамики взаимодействия эремомицина с карбоксильным катионитом БДМ-12**

$\Lambda = 30.3$		$\Lambda = 14.9$		$\Lambda = 6.4$	
V, л	v, л/ч	V, л	v, л/ч	V, л	v, л/ч
0.005	0.007	0.005	0.018	0.005	0.042
5	1.89	5	4.66	5	11.10
10	3.78	10	9.35	10	21.91

V – объем колонки, л; v – скорость протекания раствора антибиотика по колонке, л/ч.

Так как критерий  $\Lambda$  значительно превышает 1 в широком диапазоне величин, то это позволяет использовать высокие скорости подачи раствора антибиотика в колонку, особенно при  $\Lambda = 30.3$  (табл.3). При этом устанавливается регулярный режим сорбции, способствующий высокой концентрации целевого компонента на выходе разделительной системы. Понижение критерия  $\Lambda$  до значений, близких к единице, способствует увеличению скорости протекания подвижной фазы. В этом случае режим сорбции остается квазиравновесным, однако, происходит значительное размывание концентрационного профиля антибиотика в колонке и, соответственно, падает как производительность процесса, так и чистота целевого компонента. Таким образом, адекватная оценка равновесно-кинетических характеристик, влияющих на критерий  $\Lambda$ , способствует расчету и созданию наиболее оптимальных физико-химических условий реализации масштабируемого динамического разделительного процесса в условиях промышленного производства.

### **Выводы**

1. Исследованы межмолекулярные взаимодействия в системах с участием антибактериального антибиотика эремомицина и полимерных сорбентов различной молекулярной структуры. Показано, что карбоксильные катиониты наиболее селективно связываются с эремомицином, и могут быть использованы для

моделирования процессов взаимодействия в сложных биологических сорбционных системах с участием органических цвиттерионов.

2. Установлено, что максимум поглощения эремомицина карбоксильными катионитами осуществляется в области нейтральных значений pH. Показано, что поливалентный цвиттерион эремомицина в результате преобладания в его структуре основных групп, в большей степени проявляет свойства катиона, которые, прежде всего, определяются величиной общего положительного заряда. Установлена полная обратимая сорбция эремомицина на карбоксильных катионитах в условиях перехода основных групп в неионизированную форму.

3. Экспериментально-теоретический анализ данных по кинетике взаимодействия эремомицина с полимерными сорбентами позволил:

- установить внутридиффузионное (гелевое) лимитирование процесса сорбции;
- показать значительное улучшение сорбционно-кинетических характеристик при уменьшении размера зерен катионитов до 80 мкм;
- определить в условиях максимальной сорбции эффективный коэффициент диффузии ( $\sim 10^{-8} - 10^{-9} \text{ см}^2 \cdot \text{сек}^{-1}$ ), что позволяет осуществлять равновесную динамическую сорбцию антибиотика при высоких скоростях подвижной фазы;
- установить неоднородное распределение эремомицина в зёрнах карбоксильных катионитов группы БДМ и определить размер эффективного сорбционного слоя ( $\sim 20$  мкм). Для адекватной математической обработки кинетических экспериментальных данных использована модель «оболочка-ядро».

4. Показано преобладание электровалентного и гидрофобного видов взаимодействия эремомицина с полимерными сорбентами. В условиях квазиравновесного динамического взаимодействия эремомицина с карбоксильным катионитом БДМ-12 выявлен механизм перераспределения сил связывания антибиотика с сорбентом при протекании раствора по колонке. Установлены физико-химические условия элюции, способствующие обострению концентрационного профиля целевого компонента: оптимальным элюирующим раствором является 0.2М ацетатно-аммониевый буфер с pH~10.5.

5. При использовании безразмерного критерия  $\Lambda$  проведен расчёт параметров масштабирования динамического процесса получения эремомицина, сохраняющего свою нативную структуру. Показана возможность использования высоких скоростей подвижной фазы для осуществления регулярного динамического режима сорбции с выходом высококонцентрированного и очищенного целевого продукта.

6. Результаты работы показывают, что использованные модельные сорбционные системы достаточно адекватны природным системам и могут использоваться при исследовании других биологических объектов.

**Список опубликованных работ по теме диссертации:**

1. Изучение равновесия, кинетики и динамики сорбции антибактериального антибиотика эремомицина на полимерных хроматографических носителях различной структурной организации. //Материалы межвузовской научной конференции «XXIX неделя науки СПбГТУ» - Санкт-Петербург, 2000. С.106-108 (соавт. Коликов В.М.).
2. Особенности структурной организации полимерных сеток на основе ионогенного мономера и дивинильного сшивающего агента. //Материалы 10-ой международной конференции студентов и аспирантов «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений». Вторые Кирпичниковские чтения. - Казань, 2001. С.99 (соавт. Тощевикова А.Ю.).
3. Экспериментальное исследование условий оптимизации получения нового антибактериального антибиотика эремомицина. //Материалы второго конгресса молодых ученых «Научная молодежь на пороге XXI века». - Томск, 2001. С. 57-58.
4. Process Innovations in Antibiotic Chromatography. //Materials of the 25th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. – Amsterdam, Holland. 2001. P.22 (соавт. Писарев О.А., Тощевикова А.Ю., Коликов В.М.).
5. Исследование ключевых параметров равновесия сорбции антибактериального антибиотика эремомицина на карбоксильных катионитах. //Материалы научно-практической конференции и школы–семинара «Формирование технической политики инновационных наукоемких технологий», Санкт-Петербург, 2001. С. 155-159. (соавт. Коликов В.М., Писарев О.А.).
6. Особенности сорбции эремомицина карбоксильными катионитами. //ЖПХ, 2002. - Т.75, № 4.- С. 549-553 (соавт. Коликов В.М., Писарев О.А.).
7. Mass Transfer Effects in Preparative Chromatography of Antibacterial Antibiotic Eremomycin on Polymeric Sorbents. // J.Chromatogr.A. 2003. V. 1006 N1-2. P.251-260 (соавт. Коликов В.М., Писарев О.А.).
8. Sorption Equilibrium and Kinetics Parameters of Eremomycin on Different Structure Carboxylic Resins. //26<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase

- Separations and Related Techniques «HPLC 2002». - Montreal, 2002. (соавт. Коликов В.М., Писарев О.А.).
9. The New Approach to Constructing of the Grain Network Polymers With Ionogenic Groups on Surface Layer.// 4<sup>th</sup> International Symposium «Molecular Order and Mobility in Polymer Systems». - St.Petersburg, 2002. P. 232 (соавт. Ежова Н.М., Гаркушина И.С., Тощевикова А.Ю., Писарев О.А.).
  10. Study of Interactions of Antibacterial Antibiotic Eremomycin With Polymeric Crosslinked Sorbents. // “100 Years of Chromatography”, 3<sup>rd</sup> International Symposium on Separation in Biosciences. (SBS 2003) – Moskow. P. 515 (соавт. Коликов В.М., Писарев О.А.).
  11. Автоколебательные процессы сорбции антибиотиков на полимерных карбоксильных катионитах // Структура и динамика молекулярных систем. Сб. статей. г. Яльчик. 2002. С. 172-175 (соавт. Тощевикова А.Ю., Писарев О.А., Ежова Н.М.).
  12. Динамика взаимодействия антибактериального антибиотика эремомицина с карбоксильным катионитом БДМ-12. // 10 Всероссийская конференция «Структура и динамика молекулярных систем». Сб. статей. г. Яльчик. 2003. С. 236 (соавт. Тощевикова А.Ю., Писарев О.А.).
  13. Динамика взаимодействия антибактериального антибиотика эремомицина с карбоксильным катионитом БДМ-12. // Структура и динамика молекулярных систем. Яльчик. 2003. Т.2. с.173-175 (соавт. Тощевикова А.Ю., Писарев О.А.).
  14. Условия избирательного взаимодействия органического цвиттериона эремомицина с карбоксильными катионитами группы БДМ. // VII Всероссийская конференция по проблемам науки и высшей школы «Фундаментальные исследования в технических университетах». Санкт-Петербург 2003. С.284.

ПОЛЯКОВА

Ирина Валериевна

ЗАКОНОМЕРНОСТИ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В  
СИСТЕМЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ АНТИБИОТИК ЭРЕМОМИЦИН -  
ПОЛИМЕРНЫЕ СОРБЕНТЫ

03.00.02 – биофизика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук