

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СИСТЕМЕ ВОДА — ТВЕРДЫЕ ОБРАЗЦЫ НАТРИЕВОЙ СОЛИ БЕНЗИЛПЕНИЦИЛЛИНА

Т. А. Крысанова¹, Д. Л. Котова¹, Е. Г. Давыдова²

¹ Воронежский государственный университет

² Воронежский государственный университет инженерных технологий

Поступила в редакцию 5.04.12

Аннотация. Изопиестическим методом исследованы закономерности взаимодействия воды с твердыми образцами натриевой соли бензилпенициллина в широком интервале относительной активности растворителя и определены количественные характеристики гидратации. Дана оценка свободной энергии Гиббса взаимодействия воды с кристаллами антибиотика. Предложена схема межмолекулярных взаимодействий в системе «вода — антибиотик» на основе данных ИК спектроскопического анализа и квантово-химических расчетов. Определено расположение молекул воды на разных стадиях гидратации.

Ключевые слова: антибиотик, изопиесты, гидратация.

Abstract. Isopiestic method regularities of the interaction of water with a solid model of the sodium salt of benzylpenicillin in a wide range of relative activity of the solvent and the quantitative characteristics of hydration. The estimation of the Gibbs free energy of interaction of water with crystals of the antibiotic. A scheme of the intermolecular interactions in the system “water — an antibiotic” on the basis of IR spectroscopic analysis and quantum-chemical calculations. Determined the location of water molecules at different stages of hydration.

Keywords: antibiotic, izopiesty, hydration.

ВВЕДЕНИЕ

Антибиотики — одни из наиболее часто используемых в медицинской практике классов лекарственных препаратов для лечения инфекционных болезней. Они находят применение также в сельском хозяйстве, пищевой и микробиологической промышленности, в биохимических исследованиях. Антибиотики воздействуют на микроорганизмы, либо временно подавляя их размножение (бактериостатическое действие), либо вызывая их гибель (бактерицидное действие) [1, 2].

Говоря о растворах лекарственных препаратов, следует отметить, что в сложной системе «вода — биосоединение» межмолекулярные взаимодействия определяют не только растворимость соединения, но и его способность вступать в различные биологические превращения и позволяют получать сведения о биохимических процессах, происходящих в клетках живых организмов. Наряду с исследованием природы таких взаимодействий в водных растворах биомолекул большой интерес представляют особенности взаимодействия воды с твердыми образцами биосоединений, что для большинства антибиотиков является малоизучен-

ной проблемой. Следует также отметить, что антибиотики в форме твердых образцов (порошков) стабильны при хранении, а в виде водных растворов быстро теряют свою активность [3].

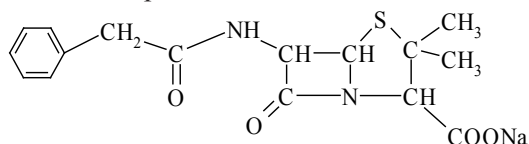
Целью работы явилось изучение закономерностей взаимодействия твердых образцов бензилпенициллина с водой в широком интервале активности растворителя и определение расположения молекул воды при образовании гидратных структур антибиотика. Полученные результаты могут быть использованы для количественного описания действия гидратации на транспортные свойства антибиотика, а также для обоснования условий его выделения, сушки и хранения в качестве лекарственного вещества.

МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования был выбран антибиотик — натриевая соль бензилпенициллина (натриевая соль [2S-(2- α ,5- α ,6- β)]-3,3-диметил-7-оксо-6-(фенилацетил)амино]-4-тиа-1-азабцикло [3.2.0]-гептан-2-карбоновой кислоты), относящийся к группе природных пенициллинов — производных 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК), ацилированных различными радикалами [3]. В работе использовали образцы фирмы «Аллерген» (Ставрополь). Некоторые физико-химические ха-

рактические характеристики натриевой соли бензилпенициллина (Benzylpenicillinum natrium) [1,4]: $T_{пл} = 215\text{ }^\circ\text{C}$; молекулярная масса 356,4 г/моль; растворимость образцов в воде при температуре 298 К — 3 г на 100 мл растворителя.

Структурная формула натриевой соли бензилпенициллина приведена ниже:



Изучение взаимодействия воды с твердыми образцами пенициллина G проводили методом изопиестирования при температуре $293 \pm 2\text{ K}$ в интервале активности паров воды (a_w) 0,110—0,990 [5]. Аппаратура, используемая для изопиестических измерений, представляла собой вакуумный эксикатор, снабженный рядом дополнительных устройств, обеспечивающих циркуляцию паров растворителя в эксикаторе, выравнивание температур. Для получения корректных результатов температура в изопиестированных сосудах изменялась незначительно и на одинаковую величину ($\pm 2\text{ K}$).

Образцы антибиотика (массой $0,1500 \pm 0,0002\text{ г}$), высушенные над CaCl_2 , а затем над P_2O_5 до постоянной массы, приводили в изопиестическое равновесие с насыщенными растворами солей, для которых известна активность молекул воды в паре [5]. Время установления изопиестического равновесия зависело от a_w и составляло от 2 до 80 суток. Определение количества поглощенной воды и контроль над установлением равновесия в исследуемой системе осуществляли методом гравиметрии по изменению массы препарата. В качестве критерия достижения равновесия служило установление постоянной массы образца, а в случае образования раствора натриевой соли бензилпенициллина — сходимость концентраций для серии из пяти параллельных измерений в идентичных условиях проведения эксперимента. Представленные в работе экспериментальные результаты обработаны методами математической статистики при доверительной вероятности 0,95 с привлечением критерия Стьюдента. Воспроизводимость результатов (S_r) составила $6,10 \cdot 10^{-2}$.

В работе применяли неэмпирические квантово-химические расчеты для моделирования межмолекулярных взаимодействий в системе антибиотик-вода. Оптимизацию геометрии проводили с помощью пакета программ HyperChem 6.0 неэмпирическим методом (*ab initio*) МО ЛКАО ССП, исполь-

зующим процедуру самосогласованного поля Хартри-Фока в сочетании с представлением молекулярных орбиталей как линейной комбинации атомных орбиталей [6, 7]. Для расчета оптимальных структур применяли минимальный базисный набор STO-3G [6, 8], в котором атомные орбитали слэтеровского типа аппроксимируются тремя функциями Гаусса, обусловленный известными соответствиями между рассчитываемым свойством и необходимым уровнем базиса, дающим результаты, наиболее близкие к экспериментальным [7, 8]. При квантово-химических расчетах проводили оптимизацию координат всех атомов до достижения минимума полной энергии системы, характеризующей вероятность данного расположения атомов.

В качестве контрольных методов использовали метод ИК-спектроскопии. ИК спектры снимали на ИК-спектрометре ФТ-2 с Фурье-преобразователем в интервале частот 4000—400 см^{-1} . Гарантией того, что условие равновесия сохраняется в системе «соль пенициллина G — вода» в течение подготовки и снятия спектров, являлось постоянство массы образца, содержащего определенное количество растворителя, в течение одного часа после достижения равновесия. Ошибка метода составляла 3 %. Интерпретацию спектров осуществляли, используя данные литературы [9—11].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На рис. 1 приведена изотерма адсорбции паров воды антибиотиком, представляющая собой зависимость количества молекул воды, взаимодействующих с препаратом (n , моль_w/моль_{препарата}), от активности растворителя (a_w). В интервале

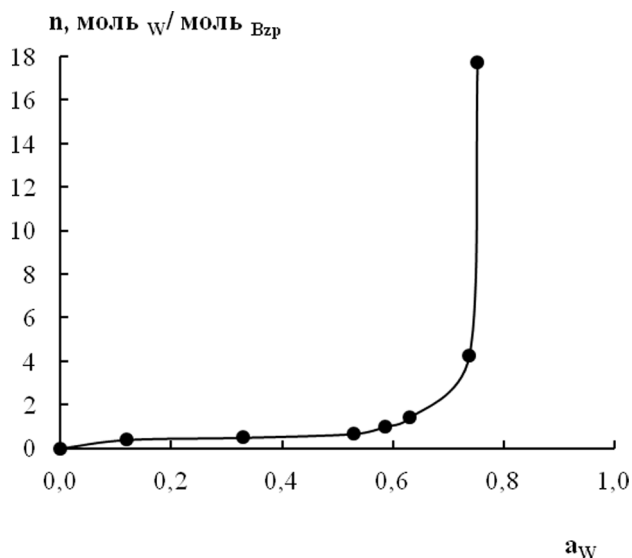


Рис. 1. Изотерма поглощения молекул воды молекулами бензилпенициллина (натриевой соли) при $T = 293\text{ K}$

$a_w = 0,110$ — $0,530$ препарат поглощает незначительное количество воды ($0,5$ моль_w/моль антибиотика). Полосы поглощения на ИК-спектре этого образца при 3680 и 3754 см⁻¹ свидетельствуют об адсорбции одиночных молекул воды на поверхности антибиотика.

В области активности растворителя $0,530$ — $0,738$ наблюдается увеличение количества поглощенной воды солью бензилпенициллина, что может быть связано с участием функциональных групп в образовании водородной связи с молекулами растворителя. При $a_w = 0,738$ количество адсорбированного растворителя составляет 4 молекулы воды на одну молекулу препарата. О локализации молекулы воды у COO-группы с образованием водородной связи указывает появление полосы поглощения при 2580 см⁻¹. Об участии имино- и карбонильной групп в образовании связей $-NH\dots H_2O$ и $>C=O\dots H_2O$ свидетельствуют соответственно полосы поглощения при 3333 и 3240 см⁻¹. Максимум поглощения при 3505 см⁻¹ позволяет говорить об образовании связи $H_2O\dots H_2O$ в структуре препарата.

Резкое возрастание гидратационной способности антибиотика отмечается при $a_w > 0,738$. Количество поглощенного растворителя при $a_w = 0,758$ составляет 18 молекул воды на одну молекулу препарата. Высокое содержание воды в структуре антибиотика способствует образованию трехмерной сетки водородных связей, в которую включены все функциональные группы соединения. Появление полосы поглощения при 2680 см⁻¹ предполагает образование связи $S\dots H_2O$. Образование ассоциатов воды, локализованных у функциональных групп β -лактамного кольца, характеризует наличие полос поглощения при 3280 и 3393 см⁻¹. Наблюдаемое значительное увеличение интенсивности линии валентных колебаний OH-групп свидетельствует об интенсификации процесса образования новых водородных связей между молекулами воды. Присутствие одиночных молекул растворителя в

структурной матрице соединения на спектрограмме образца отмечается в появлении полосы поглощения при 3690 см⁻¹. Следует отметить, что в процессе гидратации исследуемого соединения частоты колебаний C–H и C–N связей существенно не изменяются. Установлено, что при $a_w = 0,836$ соль бензилпенициллина, поглощая молекулы воды, переходит в растворимое состояние. Силы взаимодействия с антибиотиком первых молекул воды промотируют дальнейшее поглощение растворителя, то есть процесс носит кооперативный характер.

Квантово-химическое моделирование строения гидратных структур натриевой соли бензилпенициллина, согласно экспериментальным данным, выполнено путем последовательного добавления к исследуемой системе от одной до 18 молекул воды. Такой подход позволил установить расположение молекул растворителя в структуре антибиотика на разных стадиях его гидратации. В таблице приведены расстояния в оптимизированной структуре, характеризующие гидратацию антибиотика.

Для системы антибиотик — четыре молекулы воды наименьшими длинами связей (менее $1,40$ Å) характеризуются связи $COO^-\dots H_2O$ и $NH\dots H_2O$. Длина связи $CO\dots H_2O$ несколько больше, чем расстояние между молекулами воды, соединенными водородной связью. Длины связей между молекулами растворителя в оптимизированной структуре с 18 молекулами воды имеют величину меньшую по сравнению с длиной водородной связи во льду ($1,78$ Å) [12], что свидетельствует об упрочнении связи вода-вода в структуре препарата. Известно, что в структуре дипептидов, к представителям которых можно отнести бензилпенициллин, присутствуют каналы, в которых размещаются ассоциированные молекулы воды, участвующие в образовании водородных связей с составляющими дипептида [13]. Полученные результаты согласуются с данными ИК-спектроскопии и отражают

Таблица
Расстояния между атомами в оптимизированной структуре «натриевая соль бензилпенициллина — вода»

Число молекул воды	$COO^-\dots H_B$, Å	$C=O_{\beta\text{-лакт.}}\dots H_B$, Å	$C=O\dots H_B$, Å	$NH_{(1)}\dots O_B$, Å	$NH_{(2)}\dots O_B$, Å	$H_2O\dots H_2O$, Å
4	1,0730	1,5875 1,6243	1,3925	1,2475	1,6660	1,3318 1,3815 1,3898
18	1,0662	1,5992	1,3789	1,1914	1,6480	1,2515 1,2604

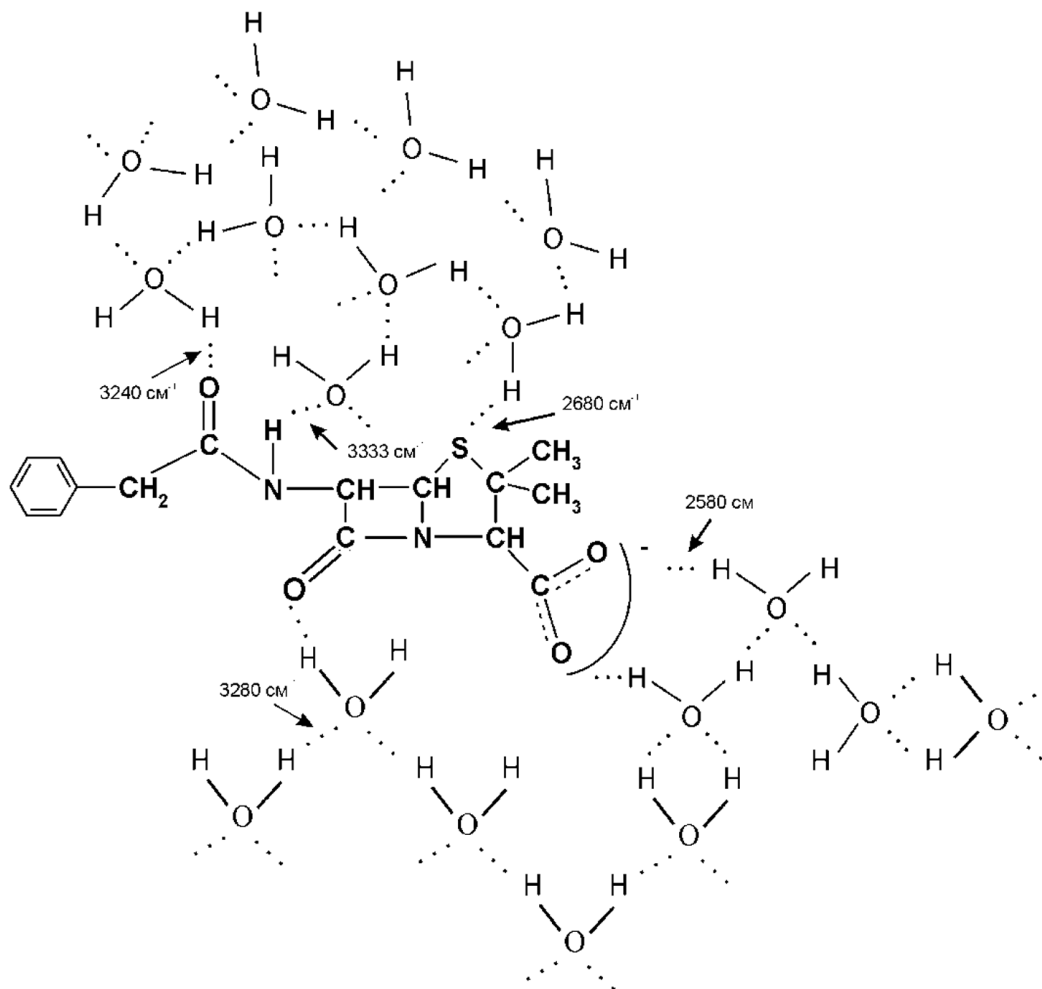


Рис. 2. Схема гидратации натриевой соли бензилпенициллина при $a_w = 0,758$

процесс образования пространственной структуры сетки водородных связей в процессе гидратации антибиотика в области высокой активности воды (рис. 2).

Из данных по изотерме поглощения воды натриевой соли бензилпенициллина при постоянстве температуры и давления было рассчитано изменение свободной энергии Гиббса взаимодействия растворителя с молекулами антибиотика (ΔG_{hydr}):

$$\Delta G_{hydr} = -RT \int_0^{n_w} \ln(a_w) dn_w,$$

где n_w — количество молей воды на моль соли бензилпенициллина; R — универсальная газовая постоянная, Дж/мольК; T — температура, К. Выражение под интегралом находили графическим интегрированием зависимости $n_w \cdot R \cdot T / (a_w) - (a_w)$.

Изменение ΔG_{hydr} (свободной энергии Гиббса) в процессе взаимодействия молекул растворителя с образцами натриевой соли бензилпенициллина определяет химическое сродство молекул воды и

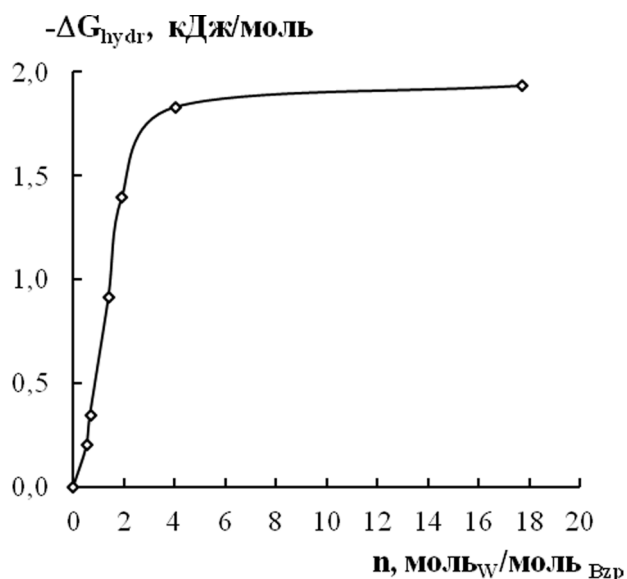


Рис. 3. Зависимость изменения свободной энергии Гиббса взаимодействия растворителя с молекулами соли бензилпенициллина от количества поглощенных молекул воды при $T = 293$ К

функциональных групп в биомолекуле (рис. 3) [14]. Значительное изменение в величине свободной энергии Гиббса наблюдается при поглощении антибиотиком первых четырех молекул воды. Данный факт подтверждает, что 4 молекулы воды локализованы у функциональных групп антибиотика с образованием водородной связи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные экспериментальные данные позволили сделать вывод о количестве молекул воды, поглощенных натриевой солью бензилпенициллина, входящих в первую и вторую координационные сферы, об энергии взаимодействия в системе вода — антибиотик, которые определяются природой, числом активных групп антибиотика, их взаимным расположением в молекуле, а также участием во внутримолекулярных Н-связях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смирнов В. В. Антибиотики / В. В. Смирнов, И. А. Василевская, С. Р. Резник. — Киев.: Вища школа, 1985. — С.14.
2. Филиппович Ю. Б. Основы биохимии / Ю. Б. Филиппович. — М.: Агар, 1999. — 512 с.
3. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров. — М.: Высш. шк., 1960. — 287 с.
4. Полюдек-Фабини Р. Органический анализ / Р. Полюдек-Фабини, Т. Бейрих. — Л.: Химия, 1981. — С. 481—496.
5. Киргинцев А. Н. Очерки о термодинамике водно-солевых систем / А. Н. Киргинцев. — Новосибирск: Наука, 1976. — С. 20.
6. Слэтер Дж. Методы самосогласованного поля для молекул и твердых тел / Дж. Слэтер. — М.: Мир, 1978. — 662 с.
7. Gaussian 03. Revision C.02 / M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel [et al.]. — Gaussian, Inc. — Wallingford CT. — 2004.
8. Head-Gordon M. A method for two-electron Gaussian integral and integral derivative evaluation using recurrence relations / M. Head-Gordon, J.A. Pople // J. Chem. Phys. — 1988. — V. 89. — P. 5777—5785.
9. Наканиси К. Инфракрасная спектроскопия и строение органических соединений / К. Наканиси. — М.: Мир, 1987. — 188 с.
10. Казицина Л. А. Применение УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектропии в органической химии / Л. А. Казицина, Н. Б. Куплетская. — М.: МГУ. — 1979. — 240 с.
11. Bellamy L. J. The Infra-Red Spectra of Complex Molecules / L. J. Bellamy. — Chapman and Hall. London, 1994. — 165 p.
12. Шапошник В. А. Неэмпирический расчет структуры и свойств ассоциатов воды / В. А. Шапошник // Сорбц. и хроматограф. процессы. — 2003. — Т. 3. — Вып. 5. — С. 599—604.
13. Карплус М. Сольватация: исследование молекулярной динамики дипептидов в воде / М. Карплус, П. Росски; под ред. С. Роуланда. — М.: Мир, 1987. — 108 с.
14. Самсонов Г. В. Сорбция и хроматография антибиотиков / Г. В. Самсонов. — Л.: Наука, 1960. — 175 с.

Крысанова Татьяна Анатольевна — доцент кафедры аналитической химии ВГУ, к.х.н.; e-mail: takrys@yandex.ru

Krysanova Tatiana A. — Associate Professor of Analytical Chemistry, Voronezh State University, Ph.D.

Котова Диана Липатьевна — д.х.н., профессор кафедры аналитической химии ВГУ

Kotova Diana L. — Ph.D., Professor of Analytical Chemistry, Voronezh State University

Давыдова Екатерина Геннадьевна — к.х.н., старший преподаватель кафедры неорганической химии, Воронежский государственный университет инженерных технологий; тел. (473) 255-3887

Davidova Ekaterina G. — Ph.D., Senior Lecturer, Department of Inorganic Chemistry; Voronezh State University of Engineering Technology; tel.: (473) 255-3887