



УДК 541.183

## Адсорбция нистатина на компонентах керамических мембран

Полунин К.Е., Дзарданов Д.В., Полунина И.А.

*ИФХЭ РАН, Москва*

Поступила в редакцию 4.05.2012 г.

### Аннотация

Исследована адсорбция полиенового антибиотика нистатина А из водных и неводных растворов на оксидах кремния и алюминия, а также керамической мембране, содержащей эти оксиды. В статических условиях получены изотермы адсорбции нистатина на оксидах из воды, метанола и диметилформамида. Установлено, что максимально плотный модифицирующий слой формируется при адсорбции нистатина из метанола на оксиде кремния. Определены оптимальные условия модифицирования керамической мембраны полиеновыми антибиотиками, исследована ее фунгистатическая активность по отношению к дрожжеподобным грибам типа *Candida utilis*.

**Ключевые слова:** нистатин, антибиотики, оксиды кремния и алюминия, модифицирование керамических мембран

In order to avoid high antifungal and hydrophobic behaviour of ceramic membranes prepared with metal oxides, polyene antibiotic Nystatin A was adsorbed from water, methanol, and dimethyl formamide at the surfaces of silica, alumina, and ceramic material. The adsorption isotherms of Nystatin were studied under static conditions. It was found that the densest modified layer is formed during Nystatin adsorption at the methanol – silica interface. Optimum conditions for the surface modification of ceramic compounds with polyene antibiotics were obtained. The microbiological activity of the modified ceramic membrane to the content of *Candida utilis* fungi in water was detected.

**Keywords:** Nystatin, antibiotics, silica, alumina, modification of ceramic membranes

### Введение

Керамические мембраны и фильтры на основе оксидов алюминия и кремния широко применяются в различных областях промышленности. Вследствие малой токсичности они могут использоваться в пищевой и фармацевтической промышленности, биотехнологии и медицине. Для придания фильтрам особых эксплуатационных свойств их поверхность модифицируется различными органическими и неорганическими соединениями [1]. В качестве модификаторов, препятствующих обрастанию фильтров и мембран различными микроорганизмами, грибами и водорослями, рекомендуется использование полиеновых антибиотиков, структура которых хорошо известна [2] и позволяет получать их синтетическим путем.

Биологическая активность полиеновых антибиотиков определяется совокупностью их важных структурных элементов – системой сопряженных

двойных связей, гидрофильной цепью макролида и функциональными группами. В настоящее время известно более 200 представителей класса полиеновых антибиотиков, многие из которых (нистатин А, амфотерицин В, леворин, микогептин и др) широко применяются на практике [3].

Молекулы нистатина содержат 4 сопряженных двойных связи, что позволяет причислить их к тетраеновым антибиотикам. Для модифицирования фильтров часто применяется смесь нистатина А с амфотерицином В под торговой маркой амфоморонал [3]. Молекулы нистатина и амфотерицина имеют одинаковый качественный и количественный набор гидрофильных групп, но полиеновая цепочка амфотерицина содержит 7 сопряженных двойных связей. В целом, молекулы полиеновых антибиотиков амфипатичны.

Нистатин оказывает фунгистатическое и фунгицидное действие, подавляя рост многочисленных патогенных и сапрофитных грибов, проявляет амебоцидное действие, активен в отношении лейшманий [2, 4]. Механизм действия антибиотика выяснен недостаточно, но имеются данные о том, что действие нистатина, как и других полиеновых антибиотиков, на грибы и некоторые простейшие связано с повреждением цитоплазматической мембраны и нарушением ее проницаемости, результатом чего является быстрая потеря клеткой низкомолекулярных водорастворимых веществ цитоплазмы. Избирательность действия полиеновых антибиотиков связывают с тем, что клеточные мембраны грибов, в отличие от клеточных мембран млекопитающих, содержат преимущественно эргостерин, а не холестерин [1, 5].

В данной работе исследована адсорбция нистатина А на оксидах алюминия и кремния – основных компонентах керамических мембран.

## Эксперимент

В качестве модификатора был выбран синтетический нистатин А (19-микозаминилнистатинолид, Nystatin А)  $C_{47}H_{75}NO_{17}$  от фирмы Acros, представляющий собой порошок желтоватого цвета со специфическим запахом и горьким вкусом. Он плохо растворим в воде и спиртах, хорошо растворяется в диметилформамиде и диметилсульфоксиде, гигроскопичен, чувствителен к действию света и окислителей [4].

Молекула нистатина содержит макролидное лактонное кольцо из 37 атомов углерода, одна сторона которого гидрофобна благодаря конъюгированной полиеновой цепи, а другая сторона, несущая 7 гидроксильных групп, гидрофильна. Макролидное кольцо также содержит 6-членное кеталическое кольцо, с которым посредством аминокликозидной связи соединен аминосахарид микозамин.

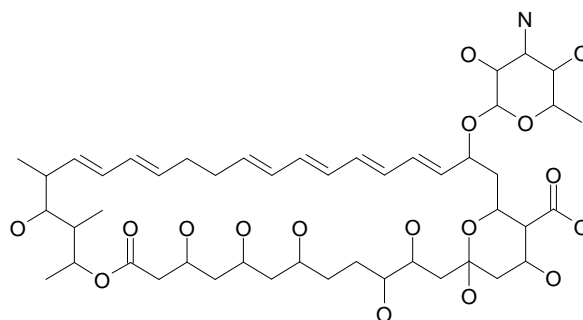


Рис. 1. Структура нистатина А

Адсорбентами служили оксиды кремния и алюминия от фирмы Merck, а также керамический материал мембраны X13AM. Характеристики адсорбентов приведены в табл.1.

Таблица 1. Физико-химические свойства исследуемых адсорбентов

Адсорбент	$S_{уд.}$ , м <sup>2</sup> /г	Свойства
Силикагель SiO <sub>2</sub>	160	Размер частиц 5 мкм, $d_p = 6-8$ нм, $V_p = 0,7$ см <sup>3</sup> /г.
Оксид алюминия Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	60	Частицы размером 60 мкм составляют 70% фракции 60-220 мкм.
Керамика X13AM*	20	Содержит 25.3% кремния, 15.7% алюминия, 2.2% титана

\*Элементный состав керамики определен путем щелочного вскрытия на приборе ICP-MS (HP-5000) с индуктивно-связанной плазмой.

В качестве растворителей использовались дистиллированная вода, метанол и диметилформамид (ДМФА) от фирмы Merck.

Адсорбция нистатина из растворителей на оксидах проводилась при комнатной температуре в стеклянных пробирках с притертыми пробками. Предварительно изучалась кинетика установления равновесия в адсорбционной системе. Время установления адсорбционного равновесия для различных оксидов не превышало 4 ч. Концентрация антибиотика в растворах до и после проведения адсорбции определялась спектрофотометрически с помощью двулучевого спектрофотометра Cintra 6 (Австралия) в области длин волн 250–340 нм. В электронных спектрах поглощения растворов нистатина в воде, метаноле и ДМФА имеются три максимума поглощения ( $\lambda_{\max}$ ) при  $291 \pm 2$  нм,  $304 \pm 2$  нм и  $319 \pm 2$  нм (рис. 2).

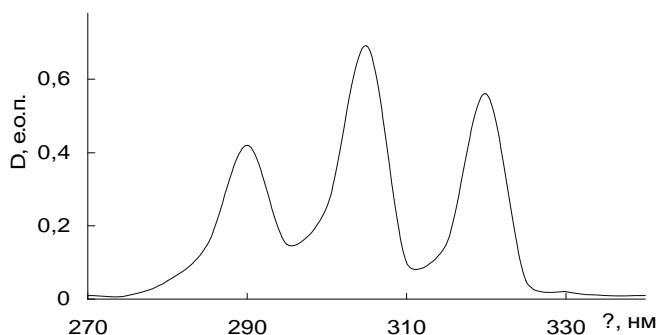


Рис. 2. Электронный спектр поглощения растворов нистатина А в воде (10 мкмоль/л)

Электронный спектр амфотерицина похож на спектр нистатина, но его максимумы сдвинуты на 5 нм в сторону больших длин волн.

Концентрация антибиотиков в растворе определялась при  $\lambda = 304$  нм с использованием калибровочных кривых для области малых (0–1 мкмоль/л) и больших (1–10 мкмоль/л) концентраций. Калибровочные кривые строились для каждой пары растворитель – антибиотик с использованием значения удельного показателя поглощения для конкретного растворителя ( $E^{1\%}$ ). Удельный показатель

поглощения нистатина в воде, метаноле и ДМФА составляет, соответственно, 740, 750 и 765. Величина адсорбции нистатина  $A$  на адсорбенте массой  $m$  рассчитывалась по формуле:  $A = (C_0 - C_p) \times V / m$ , где  $C_0$  и  $C_p$  – исходная и равновесная концентрация вещества в растворе объёмом  $V$  [6].

### Обсуждение результатов

Согласно данным [7], величина предельной растворимости нистатина в воде, метаноле и ДМФА составляет, соответственно, 100, 1000 и 33000 мг/л, т.е. нистатин лучше растворяется в органических растворителях, чем в воде. Это связано с тем, что вклад гидрофобной составляющей молекулы нистатина преобладает над вкладом его гидрофильной части в общую энергию межмолекулярных взаимодействий. В свою очередь, вода лучше смачивает гидрофильную поверхность оксидов кремния и алюминия, чем органические растворители. Взаимодействие нистатина с поверхностью оксидов зависит от соотношения кислотно-основных свойств адсорбента и адсорбата, а также их сольватации в растворе. Таким образом, в системе нистатин – оксид – растворитель устанавливается динамическое равновесие.

Изотермы адсорбции нистатина на силикагеле из метанола, диметилформамида (ДМФА) и воды приведены на рис. 3.

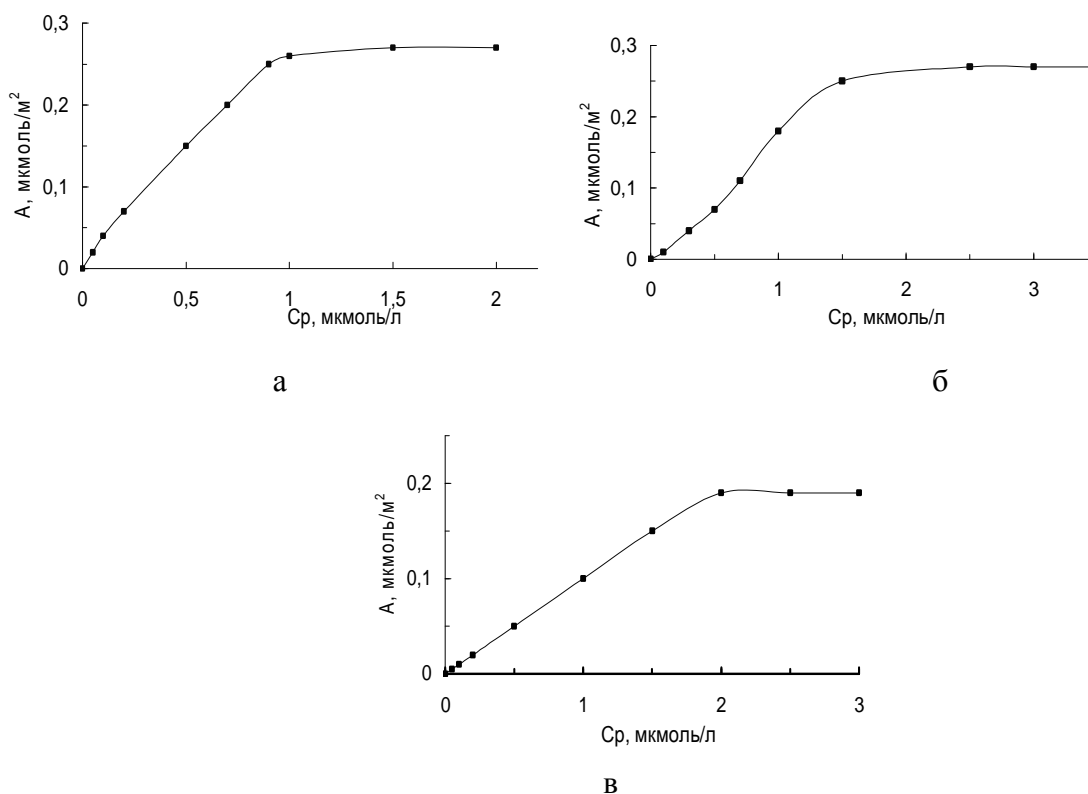


Рис. 3. Изотерма адсорбции нистатина на SiO<sub>2</sub> из метанола (а), диметилформамида (б) и воды (в)

Такой тип изотерм хорошо описывается уравнением Ленгмюра для мономолекулярной адсорбции. Все изотермы имеют довольно большой прямолинейный участок, который может быть описан уравнением Генри. Угловые коэффициенты этих уравнений существенно различаются – наиболее сильно

нистатин адсорбируется из метанола, его адсорбция из ДМФА слабее в 1,5 раза, а из воды – в 3 раза. Соответственно, и монослой формируется из метанола, ДМФА и воды при значениях равновесной концентрации 1, 1,5 и 2 мкмоль/л. Значения максимальной адсорбции нистатина на силикагеле из разных растворителей приведены в табл. 2. Наиболее плотный монослой образуется при адсорбции нистатина на силикагеле из метанола, хотя его растворимость в ДМФА в 30 раз выше. По-видимому, сильное взаимодействие нистатина с ДМФА мешает его адсорбции на поверхности оксидов. Адсорбция нистатина из воды минимальна, что связано с сильной конкурентной адсорбцией молекул воды на гидрофильной поверхности силикагеля.

Таблица 2. Максимальная адсорбция  $A_m$  нистатина на оксидах

Растворитель	$A_m$ , мкмоль/ м <sup>2</sup>	
	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Диметилформамид	0.27	0.032
Метанол	0.29	0.033
Вода	0.19	0.021

По данным [8, 9], поверхностные ОН группы оксида кремния проявляют кислые свойства, тогда как поверхность амфотерного оксида алюминия покрыта ОН группами кислого и основного характера. Кроме того, на поверхности оксида алюминия имеются координационно-ненасыщенные ионы металла, обладающие сильными электроноакцепторными свойствами.

Адсорбция нистатина на основном оксиде алюминия почти на порядок меньше, чем на оксиде кремния (табл. 2). Причем изотерма адсорбции может быть описана уравнением Ленгмюра для мономолекулярной адсорбции только при адсорбции нистатина из метанола (рис. 4а). Адсорбция из ДМФА и воды при малых концентрациях практически отсутствует, а изотермы имеют S-образную форму (рис. 4б, в). Таким образом, вследствие сильной сольватации молекул нистатина в ДМФА и сильной конкурентной адсорбции воды на Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> модификацию поверхности оксида алюминия с помощью нистатина предпочтительнее проводить из метанола

По данным [10], слабая адсорбция вещества в области его малых концентраций характеризует отсутствие специфического взаимодействия между молекулами адсорбата и адсорбента. Поскольку были исследованы адсорбенты с преимущественно кислыми и основными свойствами, то объяснение разного хода экспериментальных изотерм может быть связано с химическими свойствами нистатина, прообразом которого являются олефины. Олефины – слабые основания, которые, по данным ИК-спектроскопии [10], предпочтительно взаимодействуют с кислыми ОН-группами соединений с образованием водородных связей. На поверхности оксидов кремния и титана олефины образуют стабильные водородносвязанные комплексы с участием двойной связи олефина и кислых ОН групп адсорбентов. Нистатин также проявляет слабо основные свойства [4], поэтому монослой нистатина на оксиде кремния, вероятно, формируется при специфическом взаимодействии кислых ОН групп адсорбента с основными ОН группами нистатина.

Поверхность амфотерного оксида алюминия покрыта преимущественно основными ОН группами, поэтому энергия взаимодействия молекул нистатина с поверхностью оксида алюминия меньше, чем энергия их взаимодействия друг с другом в водных растворах или с молекулами ДМФА, в результате чего адсорбция нистатина на поверхности очень незначительна. Однако при увеличении концентрации нистатина в воде и ДМФА образуются агрегаты его молекул, которые

лучше стабилизируются на поверхности, чем в растворе, и адсорбция нистатина резко увеличивается.

Сопоставление величины адсорбции нистатина на разных оксидах в расчете на  $1\text{ м}^2$  поверхности, приведено в табл. 2. Тем же закономерностям подчиняется адсорбция на оксидах кремния и алюминия коммерческого препарата амфоронала (смесь нистатина и амфотерицина).

Результаты исследования адсорбции нистатина на модельных оксидах были сопоставлены с данными о его адсорбции на керамической мембране Х13АМ, содержащей оксиды кремния, алюминия и титана (табл. 1).

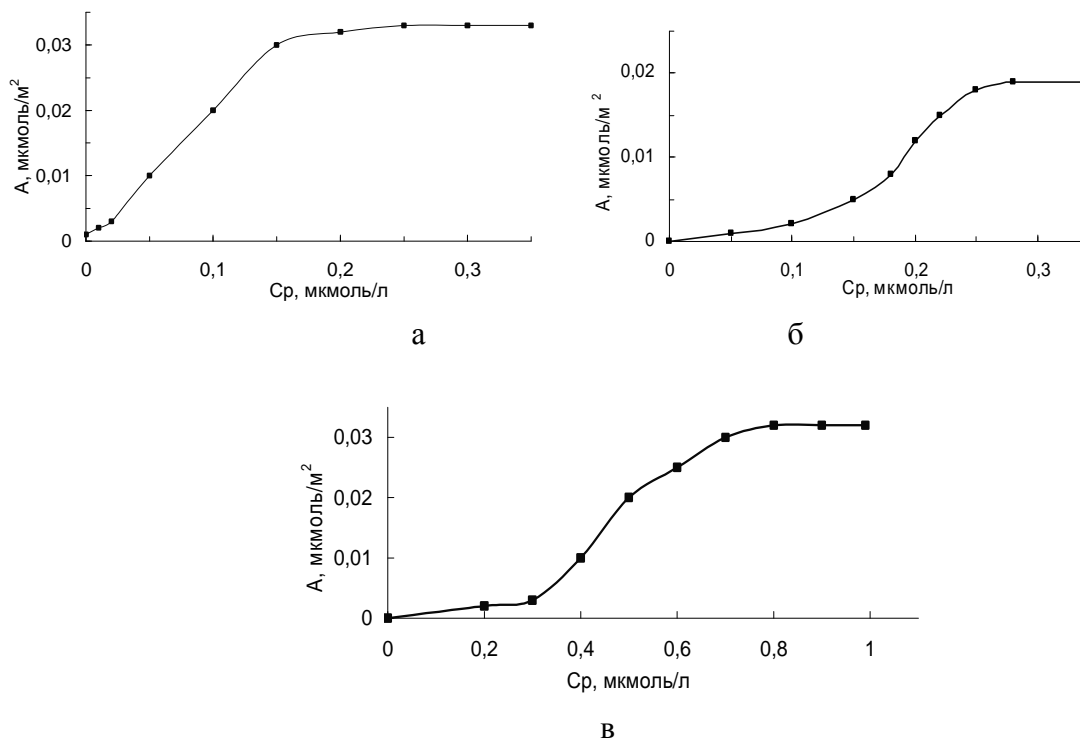


Рис. 4. Изотерма адсорбции нистатина на  $\text{Al}_2\text{O}_3$  из метанола (а), воды (б) и ДМФА (в)

По своей форме изотерма адсорбции нистатина из водных растворов на мембране Х13АМ (рис. 5) очень похожа на изотерму адсорбции нистатина на  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (рис. 4б), хотя, по данным элементного анализа, практически 50% материала мембраны состоит из оксида кремния (табл. 1). Образовавшийся монослой довольно прочно удерживается на поверхности мембраны и не смывается водой. Максимальная величина адсорбции нистатина на мембране при  $C = 2$   $\text{ мкмоль/л}$  в 2,5 раза ниже, чем на оксиде кремния, но при  $C = 7$   $\text{ мкмоль/л}$  адсорбция на мембране в 2 раза превышает адсорбцию на оксиде кремния и в 20 раз – адсорбцию на оксиде алюминия.

По-видимому, существенный вклад в энергию поверхностных взаимодействий вносит оксид титана, присутствующий в керамическом материале мембраны, который обладает довольно сильными кислотными свойствами и способен к специфическому взаимодействию с молекулами полиенов [9, 10] (рис. 6).

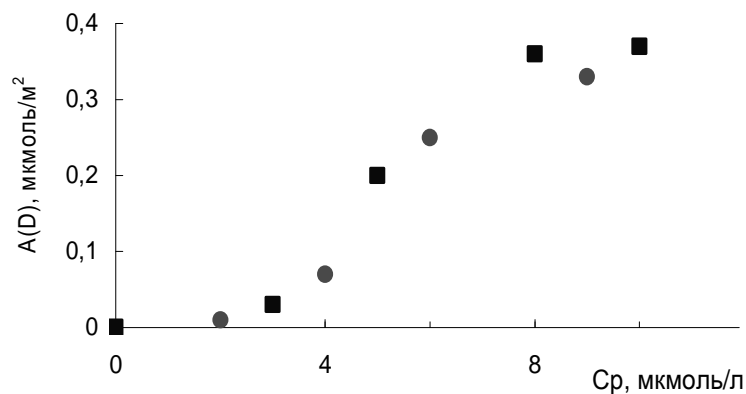


Рис. 5. Изотермы адсорбции A (■) и десорбции D(●) нистатина на мембране X13AM из воды

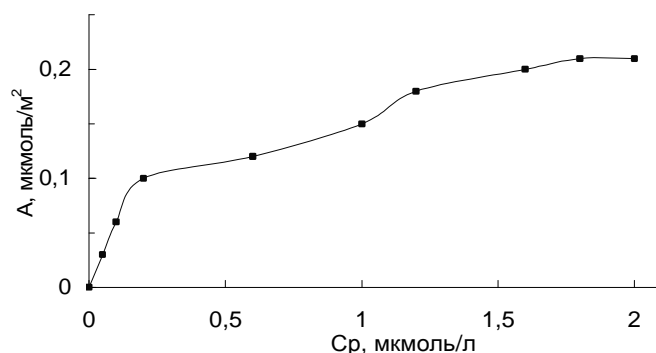


Рис. 6. Изотерма адсорбции нистатина на  $TiO_2$  из воды

Адсорбция нистатина из метанола на керамической мембране X13AM в 10 раз выше и описывается выпуклой изотермой адсорбции Ленгмюра, однако почти 80% этого моно слоя удаляются через 10 ч воздействия воды.

На рис. 7 приведены данные о микробиологической активности мембраны X13AM по отношению к дрожжеподобным грибам типа *Candida utilis* до и после ее модифицирования нистатином.

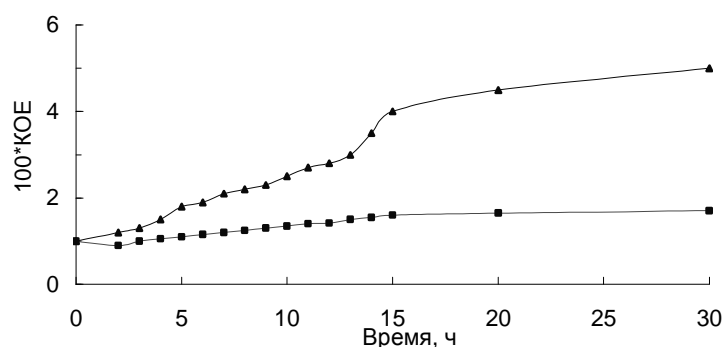


Рис. 7. Кинетика изменения концентрации колоний *Candida utilis* в воде при фильтрации воды через керамическую мембрану X13AM до (▲) и после (■) ее модификации нистатином

Установлено, что в воде, отфильтрованной через мембрану X13AM, число колоний дрожжеподобных грибов постоянно растет со временем и через 30 ч увеличивается в 5 раз, тогда как в воде, отфильтрованной через ту же мембрану

модифицированную нистатином, развитие микроорганизмов не наблюдается даже спустя 30 ч работы мембраны. Все это время уровень концентрации нистатина в воде не снижается ниже 0,007 мкмоль/л, необходимого для проявления его фунгистатической активности.

Таким образом, модифицированная нистатином мембрана способна весьма эффективно обеззараживать воду, проявлять фунгистатические свойства и препятствовать развитию колоний грибов *Candida utilis*.

Как показали микробиологические исследования [1, 5], молекулы нистатина и других полиеновых антибиотиков способны взаимодействовать с клеточными мембранами грибов, образуя в комплексе со стеринами структурные ионные каналы с определенной проводимостью. Причем установлена прямая зависимость проводимости мембран от концентрации антибиотиков и их структуры. Наличие в нистатине и амфотерицине большого количества двойных связей обуславливает высокую тропность полиенов к стеринной структуре цитоплазматической мембраны, нарушает тем самым проницаемость клетки для воды и электролитов и вызывает гибель грибов [5]. Параметры одиночных ионных каналов – их селективность, проводимость, время жизни, в открытом и закрытом состоянии, могут регулироваться посредством структурных изменений в полиеновой молекуле. По этой причине смесь нистатина с амфотерицином (амфоморонал) является наиболее эффективным фунгицидным и фунгистатическим средством.

### **Заключение**

Статическим методом изучена адсорбция нистатина на оксидах кремния и алюминия из водных и неводных растворов. Получены изотермы адсорбции нистатина, определены значения его предельной адсорбции на оксидах из воды, метанола и диметилформамида. Обнаружено, что наибольшая плотность модифицирующего слоя достигается при адсорбции нистатина из метанола на оксиде кремния, а наименьшая – при его адсорбции из воды на оксиде алюминия. Определены оптимальные условия модифицирования керамической мембраны Х13АМ, исследована ее фунгистатическая активность по отношению к дрожжеподобным грибам типа *Candida utilis*.

*Работа поддержана грантами РФФИ № 09-08-01231 и 12-08-01168.*

### **Список литературы**

1. Садыгова Л.Н. Исследование избирательной проницаемости мембран в зависимости от структуры модификатора // *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2009. Т. 39-40. С.160-162.
2. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Изд-во МГУ, 1994. 512 С.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Т.1-2. М.: ООО «Новая волна»: Издатель С.Б.Дивов, 2002. 520 С.
4. Химическая энциклопедия / Под ред. И.Л. Кнунянца. Т.3. М.: Изд-во «Большая российская энциклопедия», 1992. С. 245.
5. Касумов Х.М. Современные представления о механизме действия полиеновых антибиотиков – взаимосвязь между структурой и функцией // *Антибиотики*. 1981. Т.26. № 2. С. 143-145.



6. Экспериментальные методы в адсорбции и молекулярной хроматографии / Под ред. А.В.Киселева, В.П. Древинга. М.: Изд-во МГУ, 1973. 450 С.
7. Международная фармакопея. Т. 1-4. Изд-е 3-е. Женева: ВОЗ. 1981-1995.
8. Липпенс Б.К., Стеггерда Й.Й. Строение и свойства адсорбентов и катализаторов. Пер. с англ./ Под ред. Б.Г. Линсена. М.: Мир, 1973. С. 190.
9. Parfitt G.D. Surface Chemistry of Metallic Oxides // Pure Appl. Chem. 1976. V.48. № 2. P.415-420.
10. Давыдов А.А. ИК-спектроскопия в химии поверхности окислов. Новосибирск: Наука, 1984. 242 С.

---

**Полунина Ирина Александровна** – к.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник ИФХЭ РАН, Москва

**Полунин Константин Евгеньевич** – к.х.н., доцент, старший научный сотрудник ИФХЭ РАН, Москва

**Дзарданов Данил Валентинович** – ведущий инженер ИФХЭ РАН, Москва, 955-46-27

**Polunina Irina A.** – Ph. D, senior researcher, docent of A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences (IPCE RAS), Moscow, *E-mail:* [polunina@phyche.ac.ru](mailto:polunina@phyche.ac.ru)

**Polunin Konstantin E.** – Ph. D, senior researcher, docent of IPCE RAS, Moscow

**Dzardanov Danil V.** – researcher of IPC RAS, Moscow