

УДК 543.641:579.695:550.4.02

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СРЕДНЕЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ НЕРАСТВОРИМЫХ ПРОДУКТОВ БИОДЕСТРУКЦИИ ПАРАЦЕТАМОЛА КЛЕТКАМИ RHODOCOCCUS RUBER ИЭГМ 77

¹Коротаев М.Ю., ²Рычкова М.И., ¹Вихарева Е.В., ²Ившина И.Б.¹ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия»

Минздрава России, Пермь, e-mail: vihareva@pfa.ru;

²ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН,

Пермь, e-mail: ivshina@iegm.ru

С использованием методов гель-проникающей хроматографии и капиллярной вискозиметрии определена средняя молекулярная масса (5973,55 Да) нерастворимого в воде осадка, образующегося в культуральной жидкости *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 77 в результате бактериальной деструкции парацетамола. Установлены оптимальные условия хроматографического анализа данного осадка: сорбент – Sephadex G-100; размеры колонки – 30,0×1,5 см; элюент – 0,1 М раствор NaOH; объем вводимой пробы (0,25 % раствора полученного осадка в 0,1 М NaOH) – 0,20 см³; скорость фильтрации – 0,1 см³/мин; длина волны детектирования – 318 нм. Определено значение характеристической вязкости растворов выделенного осадка в ДМСО, равное 5,1 см³/г. Исходя из путей биодеструкции парацетамола и данных элементного анализа, высказано предположение о возможной полимеризации одного из ключевых метаболитов деградации парацетамола *p*-аминофенола.

Ключевые слова: парацетамол, биодеструкция, *Rhodococcus ruber*, капиллярная вискозиметрия, гель-хроматография, спектрофотометрия

DETERMINATION OF THE MEAN MOLECULAR WEIGHT OF THE INSOLUBLE PRODUCT FORMED DURING PARACETAMOL BIODEGRADATION BY RHODOCOCCUS RUBER IEGM 77

¹Korotaev M.Y., ²Rychkova M.I., ¹Vikhareva E.V., ²Ivshina I.B.¹State Budgetary Educational Institution of Higher Education of Health Care Ministry

Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, e-mail: vihareva@pfa.ru;

²Federal State Budgetary Scientific Institution Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
of Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Perm, e-mail: ivshina@iegm.ru

The mean molecular weight of the insoluble product of paracetamol biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 77 has been determined by gel-penetrating chromatography and capillary viscometry and makes up 5973,55 Da. The optimal conditions for chromatographic analysis of the formed precipitate were determined as being the following: Sephadex G-100 sorbent (40–120 μm bead size); column size (30,0×1,5 cm); the mobile phase – 0,1 M NaOH solution; the sample – 0,25 % (w/v) solution of the formed precipitate in 0,1 M NaOH solution; injection volume – 0,20 cm³; flow rate – 0,1 cm³/min; and detection wavelength – 318 nm. Characteristic viscosity of solutions of the formed precipitate in DMSO makes up 5,1 cm³/g. Based on paracetamol biodegradation pathways and elemental analysis data, it is proposed that the key intermediate of paracetamol biodegradation *p*-aminophenol is polymerized.

Keywords: paracetamol, biodegradation, *Rhodococcus ruber*, capillary viscometry, gel permeation chromatography, UV-Vis spectroscopy

Бурное развитие фармацевтической отрасли в последнее десятилетие сопровождается образованием и накоплением фармацевтических отходов. Попадание в окружающую природную среду высокостабильных, токсичных фармполлютантов, которые характеризуются не только необычной структуры, но и высокой биологической активностью ингредиентов, крайне нежелательно даже в относительно низких концентрациях [7]. Продолжительное выделение фармпрепаратов и их метаболитов в сточные воды может приводить к их аккумуляции и тем самым стимулировать отрицательное воздействие этих химических

соединений на окружающую среду [10]. Одним из наиболее часто обнаруживаемых в сточных, грунтовых, поверхностных водах (и даже питьевой воде) лекарственных препаратов является широко применяемый в медицинской практике парацетамол (N-(4-гидроксифенил)ацетамид) [7, 10]. Парацетамол обладает выраженным обезболивающим и антипиретическим действием. Из-за своих физико-химических свойств (наличие бензольного кольца, замещенного гидроксильной группой и ацетиламиногруппой в *para* (1,4)-положении) парацетамол потенциально персистентен, мобилен в водных и сухопутных экосистемах [10, 13].

В ранее проведенных нами исследованиях установлена способность актинобактерий *Rhodococcus ruber* разрушать химическую структуру парацетамола [3]. В процессе ферментализа парацетамола в культуральной среде родококков были идентифицированы *n*-аминофенол, гидрохинин, пирокатехин, муконовая кислота. Процесс биодеструкции парацетамола сопровождался постепенным приобретением культуральной средой коричневой окраски и последующим образованием гидрофобного темноокрашенного (благодаря присутствию хиноидных соединений) крупновидного, оседающего на дно колбы осадка. Массовая доля выхода осадка от исходного количества парацетамола составляла 20%. Жидкость над осадком оставалась прозрачной. Формирование этого осадка, возможно, связано с высокой адгезивной активностью родококков в отношении парацетамола, усиленным синтезом внеклеточных полимеров, а также полимеризацией интермедиатов (фенольных и хиноидных соединений) бактериальной деструкции парацетамола. С использованием метода солевой агрегации показано, что родококки формируют клеточные агрегаты под действием сравнительно низких (0,2–0,4 М) концентраций сульфата аммония, что свидетельствует о выраженной гидрофобности их клеточной стенки [5]. Возможность полимеризации продуктов деградации парацетамола при участии пероксидазы хрена подтверждена исследованием D.W. Potter с соавт. [12]. В работах Р. Кар с соавт. [8, 9] рассмотрена окислительная полимеризация *o*-, *m*- и *n*-аминофенола и представлены результаты определения средней молекулярной массы поли-*m*-аминофенола [8].

Цель настоящего исследования – определение средней молекулярной массы осадка, образующегося в результате биодеструкции парацетамола клетками *R. ruber* ИЭГМ 77.

Материалы и методы исследования

В работе использовали штамм *R. ruber* ИЭГМ 77 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур (WFCC) #768) [14]. Парацетамол в виде фармацевтической субстанции (Аньцю Луань Фармасьютикал Ко., Лтд., Китай) вносили в среду культивирования родококков до конечной концентрации 2000 мг/дм³. Эксперименты по биодеструкции парацетамола проводили в условиях периодического культивирования клеток *R. ruber* ИЭГМ 77 при 28°C в течение 20 сут [3]. Образовавшийся осадок (ОО) отфильтровывали, трижды промывали дистиллированной водой и высушивали до постоянной массы.

Содержание воды в ОО определяли на анализаторе влажности МА-30 (Sartorius, Германия). Элементный анализ (С, Н, N) выполняли с помощью

элементного анализатора Leco CHNS-9321P (Leco Eurore B.V., Нидерланды). Результаты элементного анализа корректировали с учётом влажности и зольного остатка, полученного в результате “мокрой” минерализации ОО [1].

Среднюю молекулярную массу ОО определяли методами гель-проникающей хроматографии и капиллярной вискозиметрии. Для определения средней молекулярной массы ОО вискозиметрическим методом готовили серию растворов ОО в ДМСО в диапазоне концентраций от 0,0125 до 0,0500 г/см³. Полученные растворы фильтровали через стеклянный фильтр с диаметром пор 100–160 мкм. Удельную вязкость ($\eta_{уд}$) растворов и растворителя определяли, измеряя время их истечения в капиллярном вискозиметре с диаметром капилляра 0,56 мм в соответствии с методикой [2] по формуле

$$\eta_{уд} = (t - t_0)/t_0,$$

где t – время истечения раствора ОО, с; t_0 – время истечения растворителя, с.

Объём растворителя и растворов ОО составлял 10,00 см³ при температуре 20°C. Расчёт средней молекулярной массы ОО осуществляли по уравнению Марка-Куна-Хаувинка [2]:

$$[\eta] = K \cdot M^a, \quad (1)$$

где a – константа, характеризующая форму макромолекулы в растворе; K – константа для данного гомологического ряда полимеров и растворителя. Параметры K и a в формуле (1) рассчитывали по данным работ Р. Кар с соавт. [8, 9] и N. Naar с соавт. [11].

Для определения средней молекулярной массы ОО методом гель-проникающей хроматографии использовали Sephadex G-100 с диаметром частиц 40–120 мкм (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), имеющий пределы фракционирования 4000–150000 Да. Хроматографическую колонку размерами 30,0×1,5 см заполняли гелем сефадекса, предварительно подогранным согласно методике [4]. Объём геля сорбента составлял 46,8 см³ при высоте наполнения в колонке 26,5 см. В качестве элюента использовали 0,1 М раствор NaOH. Исследуемым образцом являлся 0,25% раствор ОО в 0,1 М растворе NaOH. Нанесение образца на гель в объёме 0,20 см³ и хроматографирование осуществляли в соответствии с методикой [4]. Скорость фильтрации составляла 0,1 см³/мин. Для сбора фракций использовали стеклянные пикнометры вместимостью 2,00–10,00 см³. Детектирование фракций осуществляли в диапазоне длин волн 200–700 нм на спектрофотометре Lambda EZ 201 (Perkin Elmer, США). Полученные данные использовали для построения трехмерного графика, отражающего зависимость между оптической плотностью (A), объёмом выхода фракций (V_l) и длиной волны (λ).

Подбор аналитической длины волны, необходимой для определения объёма выхода элюата, соответствующего средней молекулярной массе ОО, выполняли по градуировочному графику зависимости $A(\lambda)$ для серии растворов ОО в 0,1 М растворе NaOH в диапазоне концентраций от 0,0500 до 0,2500 г/см³. Растворы ОО фильтровали через бумажные обеззоленные фильтры.

Расчет средней молекулярной массы ОО осуществляли по стандартной формуле [4]:

$$\lg M = 5,941 - 0,947 \cdot \frac{V_l}{V_0}, \quad (2)$$

где V_l – объём выхода элюата, соответствующий точке максимума на трехмерном графике зависимости

$A(V_p, \lambda)$ при выбранной длине волны, см^3 ; V_0 – объем растворителя между гранулами геля («свободный» растворитель), см^3 . Объем растворителя между гранулами рассчитывали, исходя из характеристик набухания Sephadex G-100 в воде и объема геля в колонке [4].

Результаты исследования и их обсуждение

На рис. 1 представлен график линейной зависимости приведенной вязкости ($\eta_{\text{уд}}/c$) от концентрации растворов ОО. Значение характеристической вязкости $[\eta]$, полученное посредством экстраполяции линии тренда на ось ординат, равно $5,1 \text{ см}^3/\text{г}$.

Значения K и α в формуле (1) для определения средней молекулярной массы ОО неизвестны. По данным N. Naag с соавт., значение α для полианилина, являющегося своеобразным «химическим каркасом» полиаминофенолов, составляет $0,73$ [11]. Значение K зависит от природы полимера и растворителя [6]. Так, по данным P. Kar с соавт., для одного из продуктов полимеризации *m*-аминофенола получены значения характеристической вязкости $[\eta]$ его растворов в ДМСО и средней молекулярной

массы, равные $203,0 \text{ см}^3/\text{г}$ и 100000 Да , соответственно [8]. На основании результатов исследований P. Kar с соавт. [8] и N. Naag с соавт. [11] нетрудно найти искомое значение K в формуле (1) для определения средней молекулярной массы ОО:

$$K = 203,0/100000^{0,73} = 0,0455.$$

Таким образом, средняя молекулярная масса ОО, рассчитанная по уравнению $5,1 = 0,0455 \cdot M^{0,73}$, равна $643,16 \text{ Да}$.

Для определения средней молекулярной массы ОО наряду с капиллярной вискозиметрией использовали метод гель-хроматографии. Как видно из рис. 2, на трехмерном графике зависимости $A(V_p, \lambda)$ отмечаются два пика при длинах волн 218 и 318 нм , которые соответствуют объему выхода элюата $50,00 \text{ см}^3$.

Для выбора аналитической длины волны далее были построены графики зависимости оптической плотности от длины волны растворов ОО в диапазоне концентраций (c) от $0,0500$ до $0,2500 \text{ г}/\text{см}^3$. Как видно из рис. 3, во всех электронных спектрах отмечаются максимумы поглощения при длинах волн 218 и 318 нм .

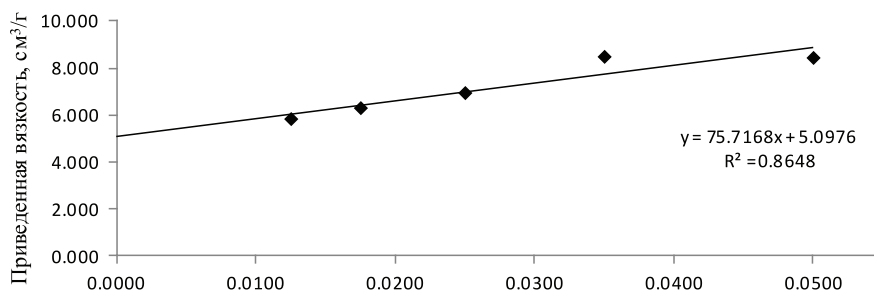


Рис. 1. Зависимость приведённой вязкости от концентрации раствора ОО

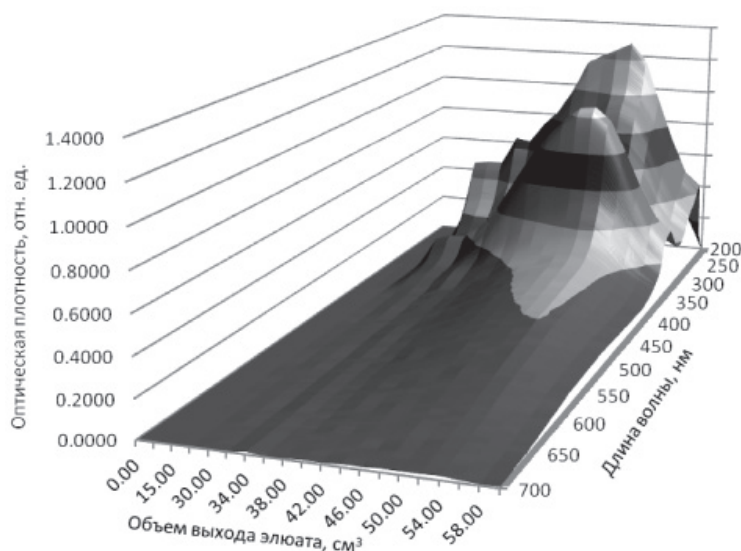


Рис. 2. Трехмерный график зависимости оптической плотности полученных фракций от объема выхода элюата и длины волны

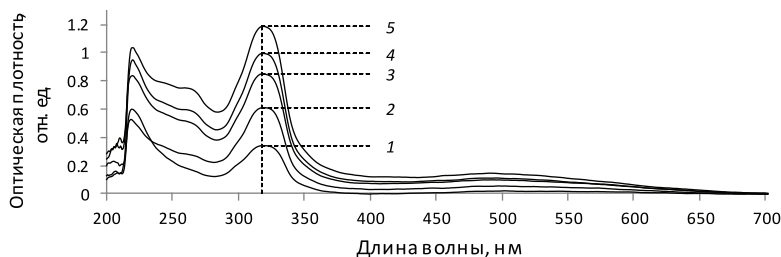


Рис. 3. Спектры поглощения растворов ОО с различными концентрациями: 1 – 0,0500 г/см³; 2 – 0,1000 г/см³; 3 – 0,1500 г/см³; 4 – 0,2000 г/см³; 5 – 0,2500 г/см³

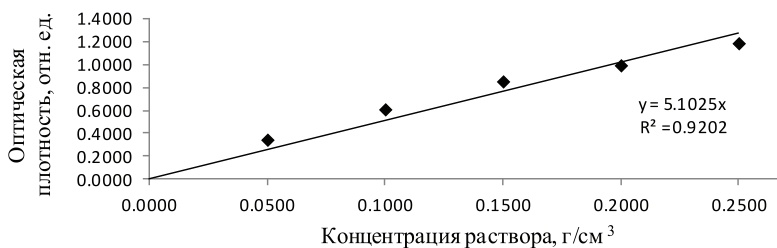


Рис. 4. Градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации раствора ОО при длине волны 318 нм

Линейная зависимость $A(c)$ проявляется при $\lambda_{\text{max}} = 318$ нм (рис. 4).

Коэффициент перехода (L) от оптической плотности к концентрации раствора ОО при 318 нм равен 5,1025. Содержание ОО (мкг) во фракциях, собранных в процессе гель-фильтрации, рассчитывали, исходя из полученного значения коэффициента L .

Распределение содержания ОО во фракциях № 5–19 представлено на рис. 5.

Как видно из рис. 5, максимальное содержание ОО отмечается во фракции № 14, соответствующей объему выхода элюата 50,00 см³.

По данным гель-фильтрации, средняя молекулярная масса ОО, рассчитанная по формуле (2), составляет 5973,55 Да. Данное значение значительно отличается от результатов (643,16 Да), полученных с ис-

пользованием метода капиллярной вискозиметрии. Это находит объяснение в использованных нами расчетных формулах. При определении средней молекулярной массы ОО методом гель-хроматографии применяли уравнение для расчета средней молекулярной массы глобулярных белков. Следовательно, для сравнения использованных нами методов необходимо внести поправку в значение α , равное 0,73 [11], использованное нами при определении средней молекулярной массы ОО вискозиметрическим методом, и приблизить его к значению 0,50, соответствующему полимерам со сферической формой молекул [6]. С учетом поправки при $K = 0,0455$ и $M = 5973,55$ Да параметр α становится равным 0,5429, что подтверждает результаты определения средней молекулярной массы ОО методом гель-хроматографии.

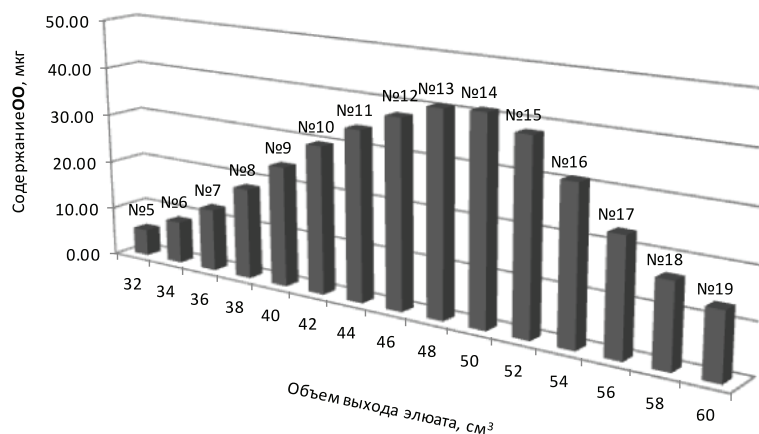


Рис. 5. Распределение содержания ОО во фракциях

Элементный состав ОО
и поли-*m*-аминофенола

Объект анализа	C	H	N	O + S
ОО	48,45	4,83	10,17	36,56
Поли- <i>m</i> -аминофенол	52,75	4,85	10,25	32,20

Результаты элементного анализа ОО, представленные в таблице, сопоставимы с теоретическими значениями содержания С, Н, N в поли-*m*-аминофеноле [8].

Заключение

Средняя молекулярная масса (5973,55 Да) осадка, образующегося в культуральной жидкости *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 77 в процессе биодеструкции парацетамола, установленная с помощью методов гель-фильтрации и капиллярной вискозиметрии, свидетельствует о полимерной природе продукта. Исходя из предложенных путей биодеструкции парацетамола [3, 15] и данных элементного анализа, в качестве одного из потенциальных мономеров может рассматриваться производное *n*-аминофенола.

Дальнейшие исследования осадка, образующегося в результате биодеструкции парацетамола клетками *R. ruber* ИЭГМ 77, будут посвящены установлению его структуры.

Исследования выполнены при частичной поддержке Программы ОБН РАН № 12 «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» (проект № 15-12-4-10) и гранта Российского научного фонда (№ 14-14-00643).

Список литературы

- ГОСТ 26929-94. Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов. – М.: Стандартинформ, 2010. – 122 с.
- Евстратова К.И., Бугреева Е.В., Купина Н.А. Практикум по физической и коллоидной химии. – М.: Высшая школа, 1990. – 255 с.
- Ившина И.Б. Алканотрофные родококки как катализаторы процесса биодеструкции не пригодных к использованию лекарственных средств / И.Б. Ившина, М.И. Рычкова, Е.В. Вихарева, Л.А. Чекрышкина, И.И. Мишенкина // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. Т. 42, № 4. – С. 443–447.
- Орлов Д.С., Гришина Л.А. Практикум по химии гумуса. – М.: Изд-во МГУ, 1981. – 272 с.
- Рубцова Е.В., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Влияние условий культивирования на адгезивную активность родококков в отношении *n*-гексадекана // Прикл. биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48, № 5. – С. 501–509.
- Шур Д.М. Высокомолекулярные соединения. – М.: Высш. шк., 1981. – 656 с.
- Huber M.M. Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: a pilot study / M.M. Huber, A. Göbel, A. Joss, N. Hermann, D. Löffler, C.S. Mcardall, A. Ried, H. Siegrist, T.A. Ternes, U.V. Gunten // Environ. Sci. Technol. – 2005. – Vol. 39, № 11. – P. 4290–4299.
- Kar P., Pradhan N.C., Adhikari B. A novel route for the synthesis of processable conducting poly(*m*-aminophenol) // Mater. Chem. Phys. – 2008. – Vol. 111. – P. 59–64.
- Kar P., Pradhan N.C., Adhikari B. Isomeric Effects on Structures and Properties of Polyaminophenols Synthesized in Basic Medium // J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem. – 2010. – Vol. 47, № 3. – P. 282–290.

10. Kolpin D.W. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance / D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber // Environ. Sci. Technol. – 2002. – Vol. 36, № 6. – P. 1202–1211.

11. Naar N. Comprehensive study and characterization of colloidal emeraldine-base / N. Naar, S. Lamouri, I. Jeacomine, A. Pron, M. Rinaudo // J. Macromol. Sci. A: Pure Appl. Chem. – 2012. – Vol. 49. – P. 897–905.

12. Potter D.W., Miller D.W., Hinson J.A. Identification of Acetaminophen Polymerization Products Catalyzed by Horseradish Peroxidase // J. Biol. Chem. – 1985. – Vol. 260, № 22. – P. 12174–12180.

13. Ternes T.A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers // Water Res. 1998. – Vol. 32, № 11. – P. 3245–3260.

14. The List of Species and Strains of IEGM Collection [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.iegm.ru/iegmcol/strains/index.html (дата обращения: 01.06.2015).

15. Wu S., Zhang L., Chen J. Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – Vol. 96, № 4. – P. 875–884.

References

- GOST 26929-94. Syr'e i produkty pishchevye. Podgotovka prob. Mineralizatsiya dlya opredeleniya soderzhaniya toksichnykh elementov [ГОСТ 26929-94. Raw material and food products. Sample preparation. Mineralization as means for determination of toxic elements]. Moscow, Standartinform, 2010. 122 p.
- Evstratova K.I., Bugreeva E.V., Kupina N.A. *Praktikum po fizicheskoy i kolloidnoy khimii* [Practical work in the physical and colloidal chemistry]. M.: Higher school, 1990. 255 p.
- Ivshina I.B., Rychkova M.I., Vikhareva E.V., Chekryshkina L.A., Mishenina I.I., *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2006, vol. 42, no 4, pp. 392–395.
- Orlov D.S., Grishina L.A. *Praktikum po khimii gumusa* [Practical work in the chemistry of humus]. M.: MSU, 1981. 272 p.
- Rubtsova E.V., Kuyukina M.S., Ivshina I.B., *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2012, vol. 48, no 5, pp. 452–459.
- Shur D.M. *Vysokomolekulyarnye soedineniya* [High molecular compounds]. M.: Higher school, 1981. 656 p.
- Huber M.M., Göbel A., Joss A., Hermann N., Löffler D., Mcardall C.S., Ried A., Siegrist H., Ternes T.A., Gunten U.V., *Environ. Sci. Technol.*, 2005, vol. 39, no 11, pp. 4290–4299.
- Kar P., Pradhan N.C., Adhikari B., *Mater. Chem. Phys.*, 2008, vol. 111, pp. 59–64.
- Kar P., Pradhan N.C., Adhikari B., *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.*, 2010, vol. 47, no 3, P. 282–290.
- Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., *Environ. Sci. Technol.*, 2002, vol. 36, no 6, pp. 1202–1211.
- Naar N., Lamouri S., Jeacomine I., Pron A., Rinaudo M., *J. Macromol. Sci. A: Pure Appl. Chem.*, 2012, vol. 49, pp. 897–905.
- Potter D.W., Miller D.W., Hinson J.A., *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, no 22, pp. 12174–12180.
- Ternes T.A., *Water Res.*, 1998, vol. 32, no 11, pp. 3245–3260.
- The List of Species and Strains of IEGM Collection* (2010), Available at: www.iegm.ru/iegmcol/strains/index.html (accessed 1 June 2015).
- Wu S., Zhang L., Chen J., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, vol. 96, pp. 875–884.

Рецензенты:

Ярыгина Т.И., д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической химии, ГБОУ ВПО «ПГФА» Минздрава России, г. Пермь;

Михайловский А.Г., д.фарм.н., профессор кафедры общей и органической химии, ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь.