

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 579.695:43.42

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОДУКТОВ БИОДЕСТРУКЦИИ ПАРАЦЕТАМОЛА АКТИНОБАКТЕРИЯМИ РОДА *RHODOCOCCLUS*

М.Ю. Коротаяев, Е.В. Вихарева

Пермская государственная фармацевтическая академия, г. Пермь
Кафедра аналитической химии

Установлены антиоксидантные свойства водорастворимых продуктов (ВП) биодеструкции парацетамола актинобактериями рода *Rhodococcus*. Значения антиоксидантной активности, определенные АБТС- и ДФПГ-методами, составили 0.0541 и 0.2263 г-экв гидрохинона /1 г ВП соответственно. Антиоксидантная активность продуктов биодеструкции парацетамола обуславливает их росторегулирующее действие на растительные организмы.

Ключевые слова: парацетамол, биодеструкция, актинобактерии рода *Rhodococcus*, антиоксидантная активность, АБТС, ДФПГ.

В настоящее время в мире насчитывается огромное количество веществ, обладающих способностью поглощать свободные радикалы. Антиоксидантные (антирадикальные) свойства ароматических соединений, как правило, связаны с наличием в их структуре фенольных гидроксиллов [1]. Известно, что органические отходы, содержащие фенолы, оказывают отрицательное воздействие на окружающую среду [2]. Однако наличие антиоксидантных свойств у данного вида отходов и продуктов их переработки может оказаться полезным при их вторичном использовании. Так, например, проявление антиоксидантной активности фенольных соединений может найти применение в электротехнике для ингибирования процессов коррозии металлов и в сельском хозяйстве для регуляции роста растений [3–5].

Весьма токсичными и часто обнаруживаемыми в сточных водах фенольными соединениями являются *n*-аминофенол и продукт его окисления – *n*-бензохинонимин, оказывающие нефротоксическое и мутагенное действие на человеческий организм [6]. Одним из источников поступления *n*-аминофенола в окружающую среду являются фармацевтические отходы, содержащие парацетамол (*N*-(4-гидроксифенил)ацетамид). В качестве экологически безопасного способа утилизации парацетамола (и *n*-аминофенола) может рассматриваться биологическая деструкция [6]. По нашим данным, при

биотрансформации парацетамола актинобактериями рода *Rhodococcus* возможны ферментативные окислительные поликонденсационные процессы, приводящие к образованию высокомолекулярных фенольных соединений. В ранее проведенных исследованиях показано, что осадок, полученный в результате биотрансформации парацетамола клетками *R. ruber* ИЭГМ 77, является высокомолекулярным соединением со средней молекулярной массой 5973.55 Да, сходен по элементному составу с поли-*m*-аминофенолом и имеет в химической структуре фенольные гидроксильные группы [7; 8]. Целью настоящей работы является исследование антиоксидантных свойств водорастворимой фракции полученного осадка.

Экспериментальная часть

Для биодеструкции парацетамола (Аньцю Луань Фармасьютикал Ко., Лтд., Китай) использовали штамм *R. ruber* ИЭГМ 77 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур (WFCC) #768, www.iegm.ru/iegmcol/strains) [9]. Выделение осадка из постферментационной среды культивирования родококков осуществляли в соответствии с условиями, описанными в [7]. Извлечение из полученного осадка водорастворимых продуктов (ВП) проводили согласно методике, представленной в работе [10]. Для определения антиоксидантной активности применяли методы, основанные на фиксировании изменения оптической плотности растворов радикалов за определенный промежуток времени при добавлении к ним растворов ВП или эталона сравнения – гидрохинона (Sigma Aldrich, USA) [1; 11–13]. Выбор гидрохинона в качестве эталона сравнения обусловлен его антиоксидантными свойствами и образованием в культуральной среде в качестве продукта биодеструкции парацетамола [14]. Для приготовления растворов радикалов использовали 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты) диаммониевую соль (АБТС) и 2,2-дифенил-1-пикрилгидразильный радикал (ДФПГ) (Sigma Aldrich, США). Измерение оптической плотности исследуемых растворов проводили на фотометре КФК-3-01 (ЗОМЗ, Россия).

АБТС-метод. Для образования катион-радикала (АБТС^{•+}) водный раствор, содержащий АБТС (7 ммоль/дм³) и персульфат аммония (2.45 ммоль/дм³), помещали в защищенное от света место на 16 час. Полученный раствор АБТС^{•+} разбавляли дистиллированной водой до оптической плотности, равной 0.55 при $\lambda=734$ нм. Рабочие растворы с содержанием ВП в интервале 110–550 мг/дм³ готовили посредством разбавления дистиллированной водой полученного

водного извлечения из осадка продуктов биодеструкции парацетамола. Содержание ВП в исходном водном извлечении устанавливали гравиметрически. Концентрации гидрохинона в водных растворах находились в интервале 5.35–26.75 мг/дм³. Для определения антиоксидантной активности в кювету с толщиной слоя 1 см помещали 3 см³ раствора АБТС^{•+} и 0.1 см³ раствора гидрохинона или ВП. С момента падения последней капли исследуемых объектов в раствор АБТС^{•+} включали секундомер и регистрировали оптическую плотность раствора относительно дистиллированной воды через каждые 10 с в течение 6 мин при $\lambda=734$ нм. Антиоксидантную активность ВП выражали в г-экв гидрохинона/1 г ВП.

ДФПГ-метод. В качестве радикального реагента использовали рабочий раствор ДФПГ в 96% этиловом спирте, приготовленный посредством разбавления его раствора исходной концентрации 0.025г/100см³. Раствор разбавляли таким образом, чтобы оптическая плотность полученного рабочего раствора ДФПГ при $\lambda=517$ нм после смешения в кювете с 96% этиловым спиртом в соотношении 2:1 равнялась 0.7. Растворителем в растворах ВП и гидрохинона являлся 96% этиловый спирт. При приготовлении растворов ВП использовали его сухой остаток. Концентрации ВП и гидрохинона в исследуемых растворах находились в диапазоне 14.67–73.33 мг/дм³ и 2.42–16.94 мг/дм³ соответственно. Для определения антиоксидантной активности в кювету с толщиной слоя 1 см помещали 2 см³ раствора ДФПГ и 1 см³ раствора гидрохинона или ВП. С момента падения последней капли исследуемых объектов в раствор ДФПГ включали секундомер и через каждые 5 с (в течение 8 мин) регистрировали оптическую плотность раствора при $\lambda=517$ нм. В кювету сравнения помещали 2 см³ 96% этилового спирта и 1 см³ соответствующего раствора ВП или гидрохинона. Антиоксидантную активность ВП выражали в г-экв гидрохинона /1 г ВП.

Результаты исследования и их обсуждение

Кинетические кривые зависимости оптической плотности растворов АБТС^{•+} и ДФПГ от времени для гидрохинона и ВП представлены на рис. 1–4.

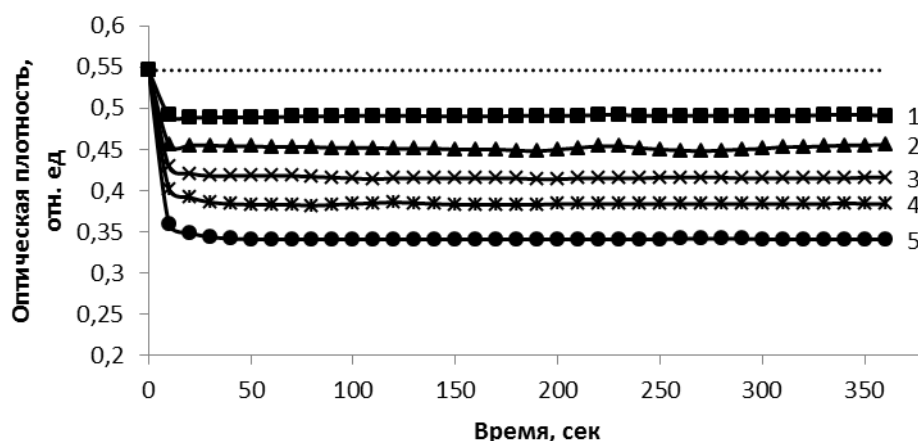


Рис. 1. Кинетические кривые зависимости оптической плотности раствора АБТС⁺⁺ от времени для растворов гидрохинона разных концентраций (мг/дм³): 1 – 5.35; 2 – 10.7; 3 – 16.05; 4 – 21.4; 5 – 26.75

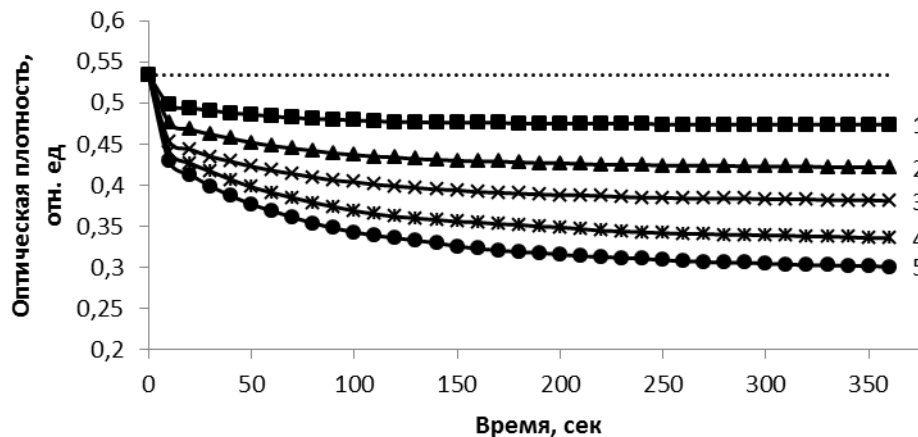


Рис. 2. Кинетические кривые зависимости оптической плотности раствора АБТС⁺⁺ от времени для растворов ВП разных концентраций (мг/дм³): 1 – 110; 2 – 220; 3 – 330; 4 – 440; 5 – 550

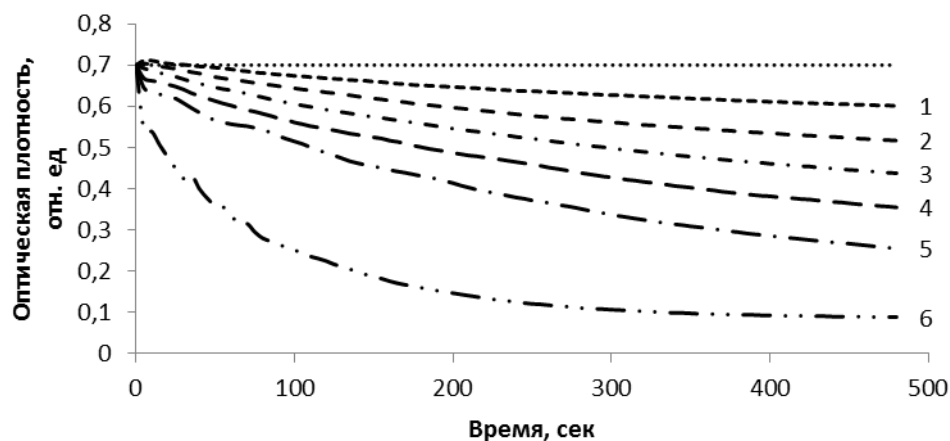


Рис. 3. Кинетические кривые зависимости оптической плотности раствора ДФПГ от времени для растворов гидрохинона разных концентраций (мг/дм^3): 1 – 2.42; 2 – 4.84; 3 – 7.26; 4 – 9.68; 5 – 12.1; 6 – 16.94

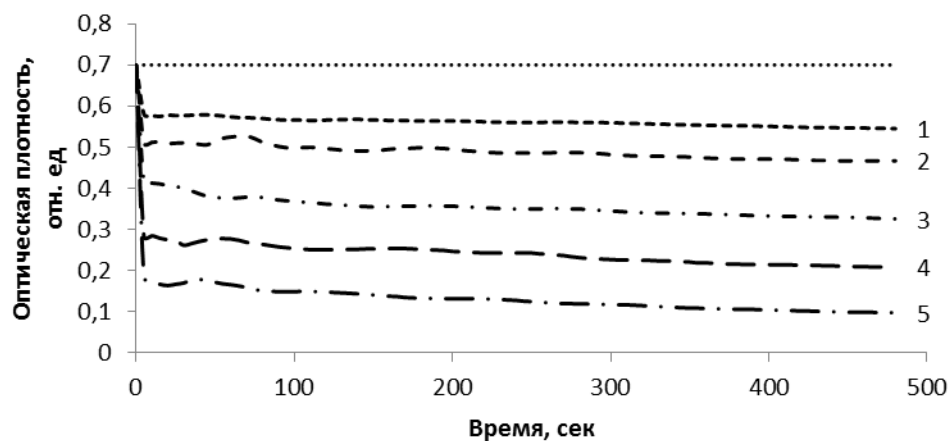


Рис. 4. Кинетические кривые зависимости оптической плотности раствора ДФПГ от времени для растворов ВП разных концентраций (мг/дм^3): 1 – 14.67; 2 – 29.33; 3 – 44.00; 4 – 58.67; 5 – 73.33

Как видно из рис. 1–4, наблюдается тенденция уменьшения оптической плотности растворов радикалов при увеличении концентрации добавляемых антиоксидантов. Данная зависимость имеет линейный характер и для значений оптической плотности растворов АБТС \bullet^+ и ДФПГ при $t=6$ мин и $t=8$ мин с момента внесения растворов ВП или гидрохинона представлена в виде графиков на рис. 5 и 6.

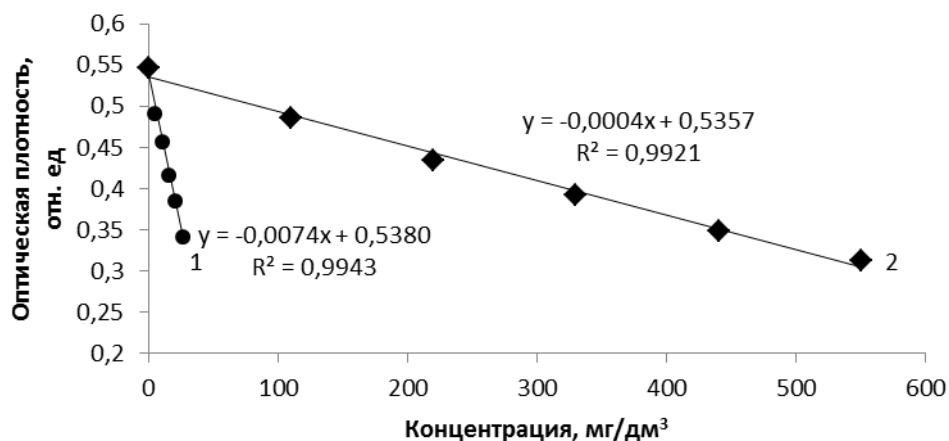


Рис. 5. Зависимость оптической плотности раствора АБТС⁺ от концентрации гидрохинона (1) и ВП (2) при t=6 мин с момента внесения растворов гидрохинона и ВП

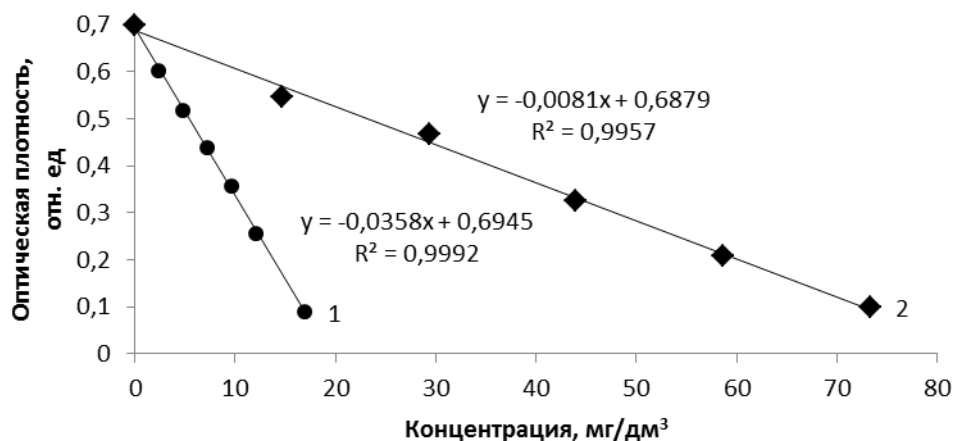


Рис. 6. Зависимость оптической плотности раствора ДФПГ от концентрации гидрохинона (1) и ВП (2) при t=8 мин с момента внесения растворов гидрохинона и ВП

Уравнения линейной регрессии, установленные по значениям оптической плотности при выбранном времени для различных концентраций гидрохинона и ВП, позволяют рассчитать антиоксидантную активность ВП, выраженную в г-экв гидрохинона/1 г ВП. Так, отношение угловых коэффициентов прямых 2 и 1 на рис. 5 и 6 равняются 0.0541 и 0.2263 соответственно. Таким образом, 1 г ВП эквивалентен 0.0541 г и 0.2263 г гидрохинона для АБТС- и ДФПГ-

методов соответственно. Меньшее значение антиоксидантной активности ВП в АБТС-методе по сравнению с ДФПГ-методом, вероятно, объясняется участием воды в образовании водородных связей с фенольными гидроксилами и различной чувствительностью данных методов.

Таким образом водорастворимые продукты биодеструкции парацетамола актинобактериями рода *Rhodococcus* обладают выраженной антиоксидантной активностью, что может быть использовано в сельском хозяйстве для предпосевной обработки семян и в электротехнике для ингибирования коррозии металлов.

Список литературы

1. Floegel A., Kim D.-O., Chung S.-J., Koo S.I., Chun O.K. // J. Food Compos. Analysis. 2011. V. 24. P. 1043–1048.
2. Кумани М.В., Соловьева Ю.А., Корнилов А.Г. // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. 2011. № 15 (110). С. 193–198.
3. Огурцов Н.А., Шаповал Г.С. // Катализ и нефтехимия. 2001. № 9–10. С. 5–13.
4. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. СПб.: ГИОРД, 2004. 240 с.
5. Мазильников Г.В., Сорокин В.В., Шиманский А.П. Пат. № 73687 Украина, МПК C05C 1/00, 9/00 (2006) // Б.и. 2005. № 8.
6. Wu S., Zhang L., Chen J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 96. P. 875–884.
7. Коротаев М.Ю., Рычкова М.И., Вихарева Е.В., Ившина И.Б. // Фундаментальные исследования. 2015. № 2. Ч. 26. С. 5850–5854.
8. Коротаев М.Ю. // Наука и образование в жизни современного общества: сб. науч. тр. по матер. междунар. науч.-практ. конф. (30 дек. 2014 г.): в 12 ч. Тамбов: ООО «Консалтинговая компания Юком», 2015. Ч. 2. С. 87–89.
9. Catalogue of Strains of Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms. 2010. URL: www.iegm.ru/iegmcol/strains/index.html.
10. Коротаев М.Ю., Солодянкина Е.С., Шибанова Е.Н. // Научный альманах. 2015. № 12-2(14). С. 372–375.
11. Thenmozhi G., JayaKumar D., Gopalswamy M., Jaya Santhi R. // Der Pharma Chemica. 2011. V. 3, № 4. P. 116–126.

12. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-evans C. // Free Radical Bio Med. 1999. V. 26. P. 1231–1237.
13. Hsu C.F., Peng H., Basle C., Travas-Sejdic J., Kilmartin P.A. // Polym. Int. 2011. V. 60. P. 69–77.
14. Ившина И.Б., Рычкова М.И., Вихарева Е.В., Чекрышкина Л.А., Мишенина И.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42, № 4. С. 443–447.

**ANTIOXIDANT PROPERTIES OF WATER-SOLUBLE PRODUCTS
OF THE PARACETAMOL'S BIODESTRUCTION BY
ACTINOBACTERIA OF GENUS *RHODOCOCCUS***

M.Yu. Korotaev, E.V. Vikhareva

Perm State Pharmaceutical Academy, Perm

Antioxidant properties of water-soluble products of the paracetamol bacterial degradation by actinobacteria of genus *Rhodococcus* cells were investigated. The values of the antioxidant activity of these products established to ABTS- and DPPH-methods are equal to 0.0541 and 0.2263 hydroquinone gram equivalent on 1 gram accordingly. Revealed antioxidant activity of water-soluble products determines their growth-regulating action on plant organisms and anticorrosive properties.

Keywords: *paracetamol, biodegradation, Rhodococcus, antioxidant activity, ABTS, DPPH*

Об авторах:

КОРОТАЕВ Михаил Юрьевич – аспирант кафедры аналитической химии Пермской государственной фармацевтической академии, e-mail: mikhail5555@mail.ru

ВИХАРЕВА Елена Владимировна – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой аналитической химии Пермской государственной фармацевтической академии, e-mail: vikhareva@pfa.ru