

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ БИОДЕСТРУКЦИИ САЛИЦИЛАТА НАТРИЯ В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕДАХ РОДОКОККОВ

А.Н. Хренков¹, Е.В. Вихарева¹, И.И. Мишенина¹, М.И. Рычкова²

¹ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия»
Минздрава России, г. Пермь
Кафедра аналитической химии

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь
Лаборатория алканотрофных микроорганизмов

В настоящей работе представлены результаты идентификации салицилата натрия и продуктов его биодеструкции в постферментационных культуральных средах родококков методом тонкослойной хроматографии. Разработан оптимальный состав системы растворителей, эффективный способ детектирования и определены пределы обнаружения салицилата натрия и его метаболитов. Получена повторяемость (сходимость) измерений коэффициентов подвижности исследуемых веществ в оптимальной системе растворителей.

Ключевые слова: *натрия салицилат, биологическая деструкция, Rhodococcus, тонкослойная хроматография.*

ВВЕДЕНИЕ

Салициловая кислота (2-гидроксибензойная кислота, CAS 69-72-7) и ее легко растворимая в воде соль – салицилат натрия (СН, CAS54-21-7) широко используются в медицинской и ветеринарной практике [1]. Массовое использование производных салициловой кислоты неизбежно приводит к попаданию их в окружающую среду, что может оказывать негативное влияние на биоту. Салициловая кислота детектируется в поверхностных и сточных водах Японии, Канады, Румынии и других стран [2]. Следует отметить, что загрязнение окружающей среды салицилатами происходит не только в результате попадания в нее фармацевтических отходов, но и в результате биоразложения нафталина, фенантрена, антрацена и других токсичных ксенобиотиков, биодеградация которых бактериями и грибами происходит через стадию образования салицилата [3,4,5].

Согласно полученным нами данным, актинобактерии рода *Rhodococcus*, являющиеся типичными представителями почвенных микробиоценозов, способны к биодеструкции СН в виде фармацевтической субстанции. Образующиеся продукты

биодеструкции СН оказывают стимулирующее действие на сельскохозяйственные и лекарственные фитокультуры [6].

В настоящей работе приводятся результаты идентификации продуктов биодеструкции СН в постферментационной среде культивирования родококков методом тонкослойной хроматографии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали СН в виде фармацевтической субстанции (белый кристаллический порошок без запаха, чистоты 99,5 %, легко растворимый в воде, производства ОАО «Усолье–Сибирский химфармзавод», Россия). В качестве биодеструктора СН использовали штамм *R. jostii* ИЭГМ 60, изолированный из нефтезагрязненной почвы и поддерживаемый в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, реестровый номер Уникальной научной установки 73559, номер 768 во Всемирном центре данных о микроорганизмах (WDCM), <http://www.iegmc.org/strains>) [7]. Родококки предварительно выращивали в течение трех суток на мясопептонном агаре («Oxoid», Великобритания), дважды отмывали 10 мМ фосфатным буферным раствором (рН 7,0) и вносили в среду культивирования в концентрации $2,0 \times 10^6$ клеток/мл. Эксперименты по биодеструкции СН проводили в условиях периодического культивирования (160 об/мин) родококков в минеральной синтетической среде RS состава (г/л): K_2HPO_4 – 2,0; KH_2PO_4 – 2,0; KNO_3 – 1,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0; NaCl – 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,02; $FeCl_3 \cdot 7H_2O$ – 0,001 в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл при температуре 28 °С. Продолжительность процесса составляла 21 сутки. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

Отбор проб культуральных жидкостей родококков для хроматографического анализа в количестве 1 мл проводили с периодичностью 2 – 4 суток. Подготовку проб, содержащих компоненты минеральной среды RS, продукты биодеструкции СН и метаболизма бактериальных клеток, проводили центрифугированием («Eppendorf», Германия) при 10000 об/мин в течение 5 минут. В качестве контролей использовали среду RS, содержащую СН в концентрации 0,2 %, не инфицированную бактериальной культурой (абиотический контроль), а также среду RS, инокулированную клетками родококков и не содержащую СН (биотический контроль или плацебо).

Для выбора оптимальных условий хроматографирования СН и продуктов его биодеструкции были апробированы 5 вариантов подвижных фаз: 1) хлороформ – этанол 96% (8:2); 2) этанол 96% – хлороформ – ледяная уксусная кислота (15:10:0,5); 3) хлороформ – ацетон – этанол 96% (15:15:10); 4) этилацетат – этанол 96% – ледяная

уксусная кислота (8:8:0,5); 5) хлороформ – ацетон (50:50). Хроматографирование проводили на пластинах «Сорбфил» ПТСХ-П-В-УФ (ЗАО «Сорбполимер», Россия). Объем анализируемых проб и свидетелей составлял 10 мкл. В качестве последних использовали этанольные растворы салицилата натрия и предполагаемых продуктов его разложения: пирокатехина («Merck», Германия), *цис, цис*-муконовой кислоты (Acros organics, США) и гидрохинона («Merck», Германия) в концентрации 10 мг/мл. Для обнаружения исследуемых веществ использовали облучение УФ светом при длине волны 254 нм (облучатель хроматографический УФС-254/365, Россия), а также обработку химическими реагентами – 30% раствором хлорида железа (III) и параами йода. Предел обнаружения исследуемых веществ определяли, используя их этанольные растворы (0,0025 – 0,325%) в количестве 10 мкл. Все растворители и реагенты были марки х.ч. или ч.д.а.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате изучения параметров удерживания НС и возможных продуктов его биодеструкции в качестве оптимальной выбрана система (2) этанол 96% – хлороформ – ледяная уксусная кислота (15:10:0,5), эффективно разделяющая исследуемые вещества и позволяющая получать коэффициенты удерживания в оптимальном диапазоне (табл. 1).

Таблица 1

Значения R_f исследуемых веществ в системах 1-5

Исследуемые вещества	Системы растворителей				
	1	2	3	4	5
НС	0,25	0,68	0,58	0,76	0,5
Пирокатехин	0,66	0,81	0,75	0,82	0,53
Гидрохинон	0,58	0,75	0,81	0,86	0,55
<i>Цис, цис</i> – муконовая кислота	0,44	0,51	–	0,80	0,18

В выбранной системе растворителей определены пределы обнаружения исследуемых веществ при использовании различных детекторов (табл. 2).

Таблица 2

**Пределы обнаружения СН и продуктов
его биодеструкции при различных способах детектирования**

Исследуемые вещества	Детектор		
	УФ свет	FeCl ₃	Пары йода
	Предел обнаружения (мкг)		
СН	1,0	2,0	3,0
Пирокатехин	1,0	2,0	1,5
Гидрохинон	2,5	2,0	1,5
<i>Цис, цис</i> -муконовая кислота	1,0	–	–

Как видно из табл. 2, наиболее чувствительным детектором СН и продуктов его биодеструкции является УФ свет при длине волны 254 нм.

Для оценки повторяемости результатов параллельных определений хроматографическую подвижность СН и продуктов его биодеструкции изучали в трехкратной повторности в выбранной системе растворителей. Результаты считали сходимыми (repeatability) при условии:

$$|X_1 - X_n| < L(P, m) \times S \text{ [8].}$$

Таблица 3

**Оценка повторяемости результатов параллельных определений
коэффициентов подвижности СН и продуктов его биодеструкции**

Исследуемые вещества	Метрологические характеристики (n=3, P=95%, L=3,31)					
	X ₁	X ₂	X ₃	X _{ср}	S	L*S
СН	0,68	0,68	0,69	0,6833	0,0057	0,01911
Пирокатехин	0,81	0,79	0,81	0,8033	0,0115	0,03822
<i>Цис, цис</i> -муконовая кислота	0,51	0,49	0,50	0,50	0,0100	0,03310
Гидрохинон	0,75	0,74	0,76	0,75	0,0100	0,03310

Примечание: X_i – экспериментально полученное значение Rf, X_{ср} – среднее значение, S – стандартное отклонение, L – фактор, вычисленный по Пирсону L(P, m) при P = 95 % [8].

Данные табл. 3 свидетельствует о повторяемости (сходимости) измерений коэффициентов подвижности СН и возможных продуктов его биодеструкции.

Разработанная методика была использована для динамического детектирования СН и его метаболитов в культуральных жидкостях родококков в процессе биодеструкции (табл. 4).

Таблица 4
Хроматографические характеристики СН и его метаболитов в культуральной жидкости *R. jostii* ИЭГМ 60 в процессе биодеструкции

Время, сутки	Значение Rf обнаруженного вещества		
	СН	Пирокатехин	Цис,цис-муконовая кислота
1	0,68±0,01	–	–
2	0,68±0,01	–	–
3	0,69±0,01	–	–
8	0,68±0,01	0,80±0,02	–
9	0,68±0,01	0,81±0,01	–
10	0,67±0,01	0,80±0,02	–
13	0,68±0,01	0,80±0,01	0,51±0,02
14	0,69±0,01	0,81±0,01	0,49±0,01
15	0,68±0,01	0,80±0,01	0,51±0,02
16	0,69±0,01	0,79±0,01	0,50±0,03
20	–	0,80±0,02	–

Примечание. Значения Rf – средние по результатам 3-х измерений.

Как видно из табл. 4, промежуточный продукт разложения СН – пирокатехин обнаруживается в культуральной жидкости родококков на 8-е сутки. Муконовая кислота начинает детектироваться на 13-е сутки, что свидетельствует о раскрытии ароматического кольца СН. На 20-е сутки в культуральной жидкости не обнаруживаются исходный субстрат СН и цис,цис-муконовая кислота, но детектируется пирокатехин. На 21-е сутки не обнаруживаются оба продукта разложения СН – пирокатехин и муконовая кислота, что свидетельствует об их дальнейшем разложении. Гидрохинон в культуральной жидкости не обнаружен. В абиотическом контроле на протяжении всего эксперимента детектируется исходный субстрат СН, его метаболиты отсутствуют.

ВЫВОД

Определены условия идентификации салицилата натрия и его метаболитов в культуральных средах родококков методом ТСХ. Разработанная методика может быть использована для изучения динамики накопления промежуточных продуктов в процессе биодеструкции данного вещества.

Исследование поддержано Комплексной программой фундаментальных исследований УрО РАН (проект № 18-4-8-21).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Регистр лекарственных средств России РЛС. Энциклопедия лекарств // Под ред. Вышковского Г.Л. – М.: Веданта, 2017. С. 134.
2. Santos L. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment / Santos L., Araujo A., Fachini A. *et al.* // *Jornal of Hazardous Materials*. 2010. V. 175. P. 45–95.
3. Civilini M., Bertoldi M., Tell G. Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* 2NR degrading naphthalene / *Lett. Appl. Microbiol.* 1999. V. 29. No. 29. P. 181–186.
4. Habe H., Omori T. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria / *Biosci. Biotech. Bioch.* 2003. V. 67. P. 225–243.
5. Ягафарова, Г.Г. Исследование биодеструкции полиароматических соединений / Г.Г. Ягафарова, Л.Р. Атнагулова, М.И. Маллябаева, Л.Ю. Хакимова, Т.В. Тюмкина // *Башкирский химический журнал*. 2014. Т. 21. № 2. С. 129–133.
6. Гапечкина, Е.Д. Исследование влияния продуктов биодеструкции салицилата натрия на энергию прорастания семян / Гапечкина Е.Д., Мишенина И.И., Вихарева Е.В., Рычкова М.И. // *Вестник ПГФА*. 2017. № 19. С.190–191.
7. Regional Specialised Collection of Alkanotrophic Microorganisms [Электронный ресурс] / URL:<http://www.iegmccl.ru> (дата обращения: 02.03.18).
8. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание. Т. 1. [Электронный ресурс] / URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1_html/HTML (дата обращения: 02.04.18).

IDENTIFICATION OF THE PRODUCTS OF SODIUM SALICILATE BIODESTRUCTURE IN CULTURAL MEDIA OF RHODOCOCCUS

A.N. Khrenkov¹, E.V. Vikhareva¹, I.I. Mishenina¹, M.I. Rychkova²

¹Perm State Pharmaceutical Academy, Perm
Department of Analytical Chemistry

²Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of Ural Branch of
the Russian Academy of Sciences, Perm
Laboratory of alkanotrophic microorganisms

In the present work, the results of identification of sodium salicylate and products of its biodegradation in post-fermentation culture media of rhodococci by thin layer chromatography are presented. The optimum composition of the solvent system, an effective method of detection, and the limits of the detection of sodium salicylate and its metabolites are determined. The repeatability (convergence) of measurements of the mobility coefficients of the test substances in an optimal solvent system is obtained.

Keywords: *sodium salicylate, biological destruction, Rhodococcus, thin-layer chromatography.*

Об авторах:

ХРЕНКОВ АЛЕКСЕЙ НИКОЛАЕВИЧ – аспирант кафедры аналитической химии, Пермская государственная фармацевтическая академия, *e-mail*: power_7_7_7@mail.ru

ВИХАРЕВА ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой аналитической химии, Пермская государственная фармацевтическая академия, *e-mail*: vihareva@pfa.ru

МИШЕНИНА ИРИНА ИВАНОВНА – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической технологии, Пермская государственная фармацевтическая академия, *e-mail*: irin-mishenin@yandex.ru

РЫЧКОВА МАРИНА ИВАНОВНА – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории алканотрофных микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, *e-mail*: richkova@iegm.ru

Поступила в редакцию 7 июня 2018 г.