

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая
академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

Хренков Алексей Николаевич

**ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ФИТОСТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ
ПРОДУКТОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ
АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ**

14.04.02 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук,
профессор Вихарева Е.В.

Пермь 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
Глава 1. АНАЛИЗ СИТУАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПЕРЕРАБОТКИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ОТХОДОВ, СОДЕРЖАЩИХ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВУЮ КИСЛОТУ	13
1.1. Фармацевтические отходы как особая группа опасных отходов	13
1.2. Концепция комплексной переработки опасных отходов. Перспективы использования фармацевтических отходов для получения новых полезных продуктов.....	15
1.3. Ацетилсалициловая кислота. Строение и свойства	19
1.4. Ацетилсалициловая кислота как фармацевтический поллютант	20
1.5. Пути метаболизма ацетилсалициловой кислоты.....	24
1.6. Фумаровая кислота как метаболит ацетилсалициловой кислоты. Строение и свойства фумаровой кислоты.....	28
1.7. Методы анализа ацетилсалициловой кислоты и ее метаболитов	29
Выводы по главе 1	31
Глава 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	32
2.1. Объекты исследования.....	32
2.2. Материалы исследования.....	33
2.2.1. Материалы, использованные при проведении процесса биодеструкции ацетилсалициловой кислоты	33
2.2.2. Материалы, использованные при исследовании продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты.....	35
2.2.3. Приготовление химических реактивов	38
2.3. Методы исследования	39
2.3.1. Определение минимальной подавляющей концентрации ацетилсалициловой кислоты в отношении алканотрофных микроорганизмов.....	39
2.3.2. Биологическая деструкция ацетилсалициловой кислоты.....	39

2.3.3. Плоскостная (тонкослойная) хроматография	40
2.3.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	40
2.3.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием.....	41
2.3.6. Антиоксидантная активность продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты. ДФПГ – метод.....	41
2.3.7. Острая токсичность	42
2.3.8. Класс опасности для окружающей природной среды.....	43
2.3.9. Фитотоксичность	43
2.3.10. Фитостимулирующее действие продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты на зверобой продырявленный.....	44
2.3.11. Кинетическое моделирование процесса биодеструкции ацетилсалициловой кислоты	46
Глава 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В ПОСТФЕРМЕНТАЦИОННЫХ СРЕДАХ РОДОКОККОВ МЕТОДОМ ВЭЖХ.....	47
3.1. Определение жизнеспособности актинобактерий в отношении ацетилсалициловой кислоты	47
3.2. Исследование деструктирующей активности родококков в отношении ацетилсалициловой кислоты	49
3.3. Разработка методики и определение остаточного содержания ацетилсалициловой кислоты в процессе биодеструкции	50
3.3.1. Выбор оптимальных хроматографических условий количественного анализа ацетилсалициловой кислоты в постферментационных средах родококков.....	50
3.3.2. Валидация методики количественного определения ацетилсалициловой кислоты в постферментационных средах родококков.....	52
3.3.3. Определение специфичности (селективности) методики	52

3.3.4. Нижний предел количественного определения ацетилсалициловой кислоты	54
3.3.5. Установление линейности методики	55
3.3.6. Определение параметров правильности и прецизионности.....	58
3.4. Определение остаточного содержания ацетилсалициловой кислоты в процессе биодеструкции.....	60
3.5. Математическое моделирование процесса биодеструкции ацетилсалициловой кислоты	62
Выводы по главе 3	64
Глава 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ПРОДУКТОВ БИОДЕСТРУКЦИИ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДАМИ ТСХ И ВЭЖХ/МС	65
4.1. Исследование химического состава продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты методом ТСХ.....	65
4.1.1. Выбор оптимального состава подвижной фазы	65
4.1.2. Определение оптимального способа детектирования и пределов обнаружения исследуемых веществ	67
4.1.3. Динамическое детектирование ацетилсалициловой кислоты и ее метаболитов в процессе биодеструкции методом ТСХ.....	69
4.2. Определение содержания фумаровой кислоты в составе продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты методом ВЭЖХ/МС.....	72
4.3. Пути метаболизма ацетилсалициловой кислоты клетками <i>R. jostii</i> ИЭГМ 60	74
4.4. Разработка технологической документации для получения фумаровой кислоты из ацетилсалициловой кислоты микробиологическим способом	76
Выводы по главе 4	78
Глава 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОДУКТОВ БИОДЕСТРУКЦИИ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ	79

5.1. Токсические свойства продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты	79
5.1.1. Острая токсичность	79
5.1.2. Класс опасности для окружающей природной среды.....	79
5.1.3. Фитотоксичность	80
5.2. Антиоксидантная активность	81
5.3. Исследование фитостимулирующего действия продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты в лабораторных условиях.....	83
5.4. Исследование фитостимулирующего действия продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты на зверобой продырявленный в условиях полевого эксперимента	84
Выводы по главе 5	85
ВЫВОДЫ	87
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	88
ПРИЛОЖЕНИЕ	114
Приложение 1.....	115
Приложение 2.....	134
Приложение 3.....	136

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСК – ацетилсалициловая кислота

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием

ГХ/МС – газовая хроматография с масс - селективным детектированием

ДФПГ – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразильный радикал

ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция

ЛД₅₀ – средняя летальная доза

ЛС – лекарственное средство

МПА – мясопептонный агар

МПБ – мясопептонный бульон

НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты

ОПС – окружающая природная среда

ПБ – продукты биодеструкции

ПВП – поливинилпирролидон

СК – салициловая кислота

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ – ультрафиолетовый

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В последние годы проводятся интенсивные исследования по биологической деструкции фармацевтических поллютантов – компонентов лекарственных средств и их метаболитов, детектируемых в окружающей среде. Интерес к данной теме вызван глобальным фармацевтическим загрязнением водных объектов: в 71 стране мира обнаружено уже более 600 веществ, относящихся к фармацевтическим препаратам (Beek *et al.*, 2016). При этом наиболее часто обнаруживаются антибиотики, эстрогены, антидепрессанты, нестероидные противовоспалительные средства и др. (Gros *et al.*, 2012, Chèvre *et al.*, 2012).

На настоящий момент накоплен значительный экспериментальный материал по биодеструкции лекарственных средств различными микроорганизмами: протеобактериями рода *Pseudomonas* (Ishiyama *et al.*, 2004; Sumera *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2007; Bart *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012; Hack *et al.*, 2015), актинобактериями рода *Rhodococcus* (Ившина и др., 2006; Gauthier *et al.*, 2010; Ivshina *et al.*, 2012, 2015, 2018, 2019), другими бактериями (Larcher *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2013; Bessa *et al.*, 2017;), а также грибами (Osorio-Lozada *et al.*, 2008, Chaudhary *et al.*, 2009; Hata *et al.*, 2010; Lloret *et al.*, 2010; Rodriguez-Rodriguez *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2010; Marco-Urrea *et al.*, 2011; Borrás *et al.*, 2011; Qi *et al.*, 2012; Rodarte-Morales *et al.*, 2012). Среди образующихся метаболитов обнаруживаются соединения с выраженной биологической, в том числе фитостимулирующей активностью. Так, в работах Мишениной и др. (2015), Коротаева и др. (2016) показано, что в процессе биодеструкции парацетамола актинобактериями рода *Rhodococcus* образуются продукты конденсации, проявляющие выраженные фитостимулирующие свойства в отношении лекарственных растений.

Наряду с парацетамолом одним из повсеместно детектируемых фармацевтических поллютантов является ацетилсалициловая кислота (АСК), широко доступное и часто применяемое в мировой медицинской практике

НПВС. Ежегодное мировое потребление АСК составляет десятки тысяч тонн, что способствует неизбежному попаданию данного вещества в окружающую среду. В связи с этим необходимы методы детоксикации данного фармполлютанта. Приоритет по показателям эффективности и экологической безопасности признается за биотехнологическими способами разложения подобных загрязнителей. Работы по биоконверсии АСК проведены с использованием различных микроорганизмов (Ishiyama *et al.*, 2004; Jouanneau *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2012; Guzik *et al.*, 2013; Hack *et al.*, 2015; Marchlewicz *et al.*, 2015; Choudhary *et al.*, 2016). Исследования направлены в основном на изучение метаболических путей процесса биодegradации данного вещества. При этом существует явный недостаток информации о разработке методик анализа АСК и образующихся метаболитов в процессе биодеструкции, скорости данного процесса, об обеспечении качества проводимых аналитических процедур и свойствах образующихся продуктов.

Степень разработанности темы диссертации. В работах, посвященных бактериальной деструкции АСК, отсутствуют сведения по разработке методик идентификации и динамического определения содержания АСК в присутствии метаболитов в постферментационных средах, о скорости процесса биодеструкции в зависимости от условий его проведения, а также данные о биологической активности, полезных свойствах и перспективах использования образующихся продуктов.

Цель настоящей работы – исследование химического состава и возможного фитостимулирующего действия продуктов бактериальной деструкции АСК.

Основные задачи исследования

1. Разработать методики идентификации и количественного определения АСК и ее метаболитов в постферментационных средах родококков.

2. Установить химический состав продуктов биодеструкции (ПБ) АСК в зависимости от условий проведения процесса. Оценить скорость процесса биодеструкции АСК в виде фармацевтической субстанции и таблеток.

3. Изучить токсические свойства ПБ АСК (острую токсичность, фитотоксичность, класс опасности для окружающей среды).

4. Исследовать возможное фитостимулирующее действие ПБ АСК в отношении лекарственных растений на примере зверобоя продырявленного *Hypericum perforatum* L.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России (номер государственной регистрации темы 01.9.50 007417).

Научная новизна. Разработана методика динамического определения содержания АСК в присутствии метаболитов в постферментационных средах родококков методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. С использованием математического моделирования проведен анализ скорости процесса биодеструкции АСК в виде фармацевтической субстанции и таблеток. На основании данных ТСХ и ВЭЖХ/МС установлен химический состав ПБ и пути бактериальной деструкции АСК с образованием нетоксичных конечных метаболитов. Впервые показано фитостимулирующее действие ПБ АСК на лекарственное растение зверобой продырявленный *Hypericum perforatum* L. Установлено, что фитостимулирующий эффект ПБ АСК обусловлен присутствием в их составе фумаровой кислоты и зависит от ее концентрации.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные сведения расширяют представление о свойствах и биологической активности ПБ АСК. Определен их химический состав и основные пути разложения АСК, превращающейся вследствие раскрытия ароматического кольца либо в *цис*, *цис*-муконовую, либо в фумаровую кислоты. Определены параметры скорости процесса биодеструкции АСК. Показано, что ПБ АСК являются

умеренно токсичными, мало опасными для окружающей среды и проявляют слабую антиоксидантную активность по сравнению с аскорбиновой кислотой. Фитостимулирующее действие ПБ АСК на лекарственные растения обусловлено присутствием в их составе фумаровой кислоты. Разработаны методики идентификации и динамического хроматографического определения содержания АСК в присутствии метаболитов в постферментационных средах родококков. Методика идентификации АСК и её метаболитов методом ТСХ применяется в лабораторном практикуме студентов при изучении дисциплины «Аналитическая химия» в Пермской государственной фармацевтической академии (Акт внедрения от 30.01.2018). Методика количественного определения АСК методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в постферментационных средах родококков с положительным результатом апробирована в РИЦ «Фарматест» (Акт апробации от 22.04.2019). Методика количественного определения фумаровой кислоты как продукта биодеструкции АСК методом ВЭЖХ/МС апробирована в ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» (Акт апробации от 26.03.2020). Разработан лабораторный регламент получения продуктов бактериальной деструкции АСК, содержащих фумаровую кислоту. ПБ АСК могут применяться в качестве стимуляторов роста растений, в том числе лекарственных, и индукторов накопления в них биологически активных веществ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты разработки методик определения остаточного содержания АСК в процессе биодеструкции и химического состава ПБ АСК.
2. Пути изменения химического состава ПБ АСК в зависимости от условий проведения процесса.
3. Результаты исследования токсических и фитостимулирующих свойств ПБ АСК.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на научно-практической конференции с международным участием «Создание конкурентоспособных лекарственных средств – приоритетное направление инновационного развития фармацевтической науки», посвященной 80-летию ПГФА, Пермь, 2016 г.; Всероссийской научно-технической конференции молодых ученых «Физика, химия и новые технологии» (XXIV Кургинские чтения), Тверь, 2017 г.; VIII международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения», Санкт-Петербург, 2017 г.; Международной научно-практической конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни», Пермь 2018 г.; научно-практической конференции с международным участием «Создание конкурентоспособных лекарственных средств – приоритетное направление инновационного развития фармацевтической науки», Пермь, 2018 г.; XXVI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», Москва, 2019 г.; научно-практической конференции с международным участием «Создание конкурентоспособных лекарственных средств – приоритетное направление развития фармацевтической науки», Пермь, 2019 г.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности «Фармацевтическая химия, фармакогнозия», конкретно пункту 4 «Разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 4 – в изданиях, входящих в утвержденный ВАК перечень рецензируемых изданий.

Личный вклад автора. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора, принимавшего

непосредственное участие во всех этапах работы: проведении анализа литературных источников по теме диссертации, планировании и выполнении научных экспериментов, интерпретации результатов, подготовке и написании научных публикаций, диссертации и автореферата.

Объем и структура работы. Работа изложена на 140 страницах машинописного текста, содержит 25 таблиц и 24 рисунка. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (главы 2–5), выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 202 наименования работ, в том числе 71 отечественных и 131 зарубежных авторов, и приложения.

Глава 1. АНАЛИЗ СИТУАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПЕРЕРАБОТКИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ОТХОДОВ, СОДЕРЖАЩИХ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВУЮ КИСЛОТУ

1.1. Фармацевтические отходы как особая группа опасных отходов

К фармацевтическим отходам относятся отходы фармацевтической промышленности, т.е. отходы, образующиеся на всех стадиях производства ЛС, а также отходы, представляющие собой непригодные к использованию ЛС, попавшие в сеть обращения и находящиеся в аптечных организациях, лечебно-профилактических учреждениях и у населения (рис. 1.1.). Следует отметить, что фармацевтические отходы, образующиеся в лечебно-профилактических учреждениях, по классификации медицинских отходов отнесены к отходам, близким по составу к промышленным [50].



Рис.1.1. Классификация фармацевтических отходов.

Согласно Базельской конвенции «О контроле над трансграничной перевозкой отходов и их удалением» (1994), фармацевтические отходы

относятся к категории опасных отходов [2]. Под опасными подразумеваются отходы, содержащие в своем составе вещества, обладающие опасными свойствами (токсичность, взрывчатость, пожароопасность и пр.) и присутствующие в количестве, опасном для здоровья человека и окружающей среды [23].

Вихаревой Е.В. предложен классификатор ЛС по классам опасности для окружающей природной среды, включающий 942 наименования ЛС. Показано, что 35,1 % ЛС являются чрезвычайно опасными, 22,9 % – высоко опасными, 21,7 % – умеренно опасными, 18,9% – мало опасными и лишь 1,4% – практически не опасными для окружающей среды [8, 9].

Существующий в настоящее время в Российской Федерации порядок обращения с фармацевтическими отходами регламентирует на федеральном уровне только стадию их уничтожения [31, 35]. Хотя система обращения с опасными отходами включает стадии образования, сбора, транспортировки, переработки, обезвреживания и размещения в окружающей среде не утилизируемых остатков.

Порядок уничтожения изъятых из сети обращения фармацевтических отходов регламентируется Постановлением Правительства РФ от 03.09.2010 N 674 (ред. от 16.01.2016) "Об утверждении Правил уничтожения недоброкачественных лекарственных средств, фальсифицированных лекарственных средств и контрафактных лекарственных средств", письмом Минздравсоцразвития России от 10.07.2012 № 2110595-25-1 «О порядке отпуска и уничтожения кодеинсодержащих лекарственных препаратов» и Законом РФ «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 № 61-ФЗ (ред. от 02.08.2019) [36, 37, 40]. Регламентируемые способы уничтожения фармацевтических отходов – сжигание, слив в промышленную канализацию и размещение на санитарных полигонах не являются экологически безопасными. При сжигании большинства фармацевтических отходов образуются токсичные продукты. Поэтому во избежание загрязнения атмосферы данными продуктами необходимо использовать закрытые

специализированные термомодули, обеспечивающие температурный режим не ниже 1100⁰С. В связи с этим способ требует больших экономических затрат. Слив в промышленную канализацию может использоваться только для ЛС, растворимых в воде, после стократного разбавления их водой. При этом рекомендуемая степень разбавления не всегда учитывает предельно допустимую концентрацию ЛС в воде, которая для большинства из них не определена. На санитарных полигонах разрешено размещение отходов только с низкой (IV и V класс) степенью опасности для окружающей среды, поэтому большинство фармацевтических отходов данным способом уничтожить нельзя и необходимо использовать либо сжигание, либо слив в промышленную канализацию.

Аптечные организации и лечебно-профилактические учреждения передают непригодные для использования ЛС на договорных условиях организациям, имеющим лицензию на уничтожение опасных отходов. Уничтожение ЛС производится вышеописанными способами.

Население из-за отсутствия системы сбора фармацевтических отходов утилизирует непригодные к использованию ЛС либо сливом в канализацию, либо помещением в контейнеры для твердых бытовых отходов (ТБО), откуда они попадают на полигоны ТБО, несмотря на высокий класс опасности для окружающей природной среды.

Таким образом, анализ ситуации по утилизации фармацевтических отходов показал, что в настоящее время актуален поиск экологически безопасных способов их уничтожения (с использованием микроорганизмов в частности), а также рациональных способов их переработки для получения новых полезных продуктов.

1.2. Концепция комплексной переработки опасных отходов. Перспективы использования фармацевтических отходов для получения новых полезных продуктов

Концепция комплексного управления отходами предполагает, что в дополнение к традиционным способам уничтожения отходов (сжиганию,

растворению, захоронению) неотъемлемой частью утилизации отходов должна стать их вторичная переработка [35]. В отношении ЛС известны лишь единичные случаи их переработки с последующим использованием в медицинских целях. Так, в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 23.09.90 № 350 подлежали промышленной переработке ряд наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров [39]. В данный перечень входили препараты изохинолина, в частности, морфин в виде субстанции и раствора для инъекций, кодеин, а также героин, тебаин, эргометрин, эрготамина, эфедрин в виде субстанции и таблеток.

Наряду с промышленной переработкой ЛС перспективным является другой возможный путь их вторичного использования, например, в органическом синтезе. Так, в работах Вихаревой Е.В. показана возможность вторичного использования непригодных к медицинскому применению ЛС, производных изохинолина для синтеза новых биологически активных соединений. В качестве фармакологической матрицы выбран дротаверина гидрохлорид, препараты которого занимали одно из первых мест в списках бракованных и фальсифицированных ЛС. На основе регенерированного из лекарственных форм основания дротаверина получены новые соединения, обладающие прокоагулянтным действием, а также прямым антикоагулянтным действием, не уступающим по уровню активности аналогу по структуре папаверину при меньшей токсичности [9].

В работах Плотникова А.Н с соавт. показано, что в составе промежуточных продуктов биодеструкции кодеина актинобактериями рода *Rhodococcus* присутствует 14-гидроксикодеинон, который является важным звеном в синтезе 14-гидроксиноморфинонов – широко используемых наркотических анальгетических средств, а также антагонистов опиатных рецепторов – оксикодона, нороксиморфона, налтрексона и др. [19, 41]. 14-Гидроксиноморфиноны получают полусинтетически из тебаина – второстепенного компонента опиумной смолы, обладающего высокой

стоимостью ввиду низкого содержания (0,5%) в исходном сырье. В связи с этим существуют разные схемы синтеза 14-гидроксинорморфинонов из более доступных по сравнению с тебаином веществ – кодеина и морфина, содержащихся в природном сырье в количестве 2 % и 10 % соответственно.

Следует отметить, что реакция химического окисления кодеина (или морфина) при C-14 обычно проходит в несколько стадий. Так, для синтеза налтрексона и налоксона проводят реакции морфинана с бромцианом или хлорформиатом, либо получают N-оксиды, либо используют фотохимическое деметилирование, либо катализируемое палладием деметилирование – ацилирование [44]. Для получения 14-гидрокси Кодеинона в качестве исходного субстрата используется также Кодеинон. Прямое окисление его до 14-гидрокси Кодеинона можно осуществить широким спектром окисляющих реагентов. Однако большинство реакций дают очень малый выход целевого продукта. Наибольший выход 14-гидрокси Кодеинона (37 %) достигнут при использовании диметилнадуксусной кислоты [101]. Известна также шестиэтапная химическая трансформация кодеина в нороксиодон и далее в нороксиморфон с использованием полученного фотохимическим способом синглетного кислорода, а также прямое аллиловое окисление кодеина хромовой кислотой в 14-гидроксипроизводные морфина [44].

В целом большинству химических методов синтеза 14-гидрокси Кодеинона свойственны недостатки, заключающиеся в низких выходах целевого продукта, продолжительности во времени, применении тяжелых металлов, оказывающих негативное воздействие на окружающую среду. В связи с этим использование альтернативных биологических методов для выполнения данной задачи перспективно и рационально в виду сокращения химической операции до одной стадии, проводимой микроорганизмами в водной среде. При этом выход 14-гидрокси Кодеинона при использовании, например, клеток *Pseudomonas putida* m10 и кодеина в качестве субстрата составляет 24,0%, при использовании грибов *Trametes*

sanguinea и *Trametes cinnabarina* и тебаина в качестве субстрата – 40% и 15 % соответственно [92, 197, 198].

В работах Мишениной И.И. с соавт. и Коротаева М.Ю. с соавт. показано, что продукты биодеструкции парацетамола актинобактериями рода *Rhodococcus* проявляют выраженные фитостимулирующие свойства в отношении лекарственных растений и могут использоваться как индукторы накопления в них биологически активных веществ. Так, обработка семян подорожника ланцетного продуктами бактериальной деструкции парацетамола, способствует повышению их всхожести и увеличению сухой биомассы растений [21, 32]. Следует отметить, что фармацевтическая субстанция парацетамола обладает токсичными свойствами [76]. Продукты биодеструкции парацетамола увеличивают содержание эфирного масла в листьях мяты перечной и содержание флавоноидов в цветках календулы лекарственной [16, 34, 53]. Коротаевым М.Ю. установлено, что продукты биодеструкции парацетамола представляют собой смесь веществ полимерной природы со средневесовой молекулярной массой 6 кДа. В составе их молекул присутствуют «симметричные» и «асимметричные» участки, включающие аминофенольные, феноксазиновые, индольные и бензофурановые фрагменты. Фиторегулирующее действие продуктов биодеструкции парацетамола обусловлено их антиоксидантными свойствами и влиянием на функциональную активность пероксидазы [26].

Важно отметить, что процессы биодеструкции лекарственных средств (парацетамола, ацетилсалициловой кислоты, дротаверина гидрохлорида, кодеина фосфата, диклофенака натрия и др.) описываются кинетическим уравнением первого порядка $dx/dt = -kx$, что показано в работах Вихаревой Е.В. с соавт. [3, 5, 7, 22, 29, 51, 54, 65]. Кинетическое моделирование позволяет прогнозировать продолжительность процесса биодеструкции вещества, время выхода метаболитов, в том числе целевого (полезного) продукта, а также сократить количество дорогостоящих микробиологических и химических экспериментов.

Таким образом, использование биологической трансформации фармацевтических отходов перспективно для получения продуктов с новыми полезными, в том числе фитостимулирующими свойствами.

1.3. Ацетилсалициловая кислота. Структура и свойства

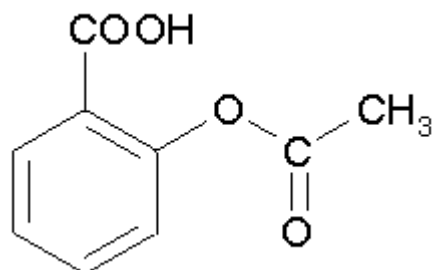


Рис. 1.2. Структурная формула ацетилсалициловой кислоты.

АСК (2-ацетилоксибензойная кислота, CAS 50-78-2) представляет собой белый кристаллический порошок, хорошо растворимый в этиловом спирте, диэтиловом эфире и хлороформе, растворимый в воде (рис. 1.2) [14]. Значение рКа составляет 3,5. В водных растворах АСК гидролизуеться на уксусную и салициловую кислоты (СК).

АСК относится к группе НПВП и широко используется как противовоспалительное, антитромбоцитарное, обезболивающее и жаропонижающее средство при лихорадочных состояниях, головной боли, ревматизме и др. Механизм действия АСК состоит в том, что она необратимо и избирательно ингибирует фермент циклооксигеназу, который ускоряет синтез простагландинов. Влиянием на синтез простагландинов объясняется характерный побочный эффект АСК – язвенное действие на слизистую оболочку желудка [99]. АСК не является остро токсичным веществом при пероральном введении лабораторным животным (LD₅₀ 1500 мг/кг и 1100 мг/кг у крыс и мышей соответственно). Однако АСК – известный системный аллерген и может вызывать анафилаксию в самом низком диапазоне терапевтических концентраций (10 мг/кг) [67].

1.4. Ацетилсалициловая кислота как фармацевтический поллютант

Потребление АСК во всем мире составляет порядка 40 000 тонн в год [113]. В России используется более 200 наименований одно- и многокомпонентных лекарственных форм АСК (таблетки, капсулы, саше и др.), а также СК (растворы спиртовые, мази, пасты) [48].

Количество отходов при производстве лекарственных препаратов, содержащих АСК и СК, в Российской Федерации составляет порядка 60 тонн в год. Данное количество приведено с учетом числа предприятий, производящих лекарственные формы АСК и СК (табл. 1.1), и отходов одного предприятия (АО «Медисорб», г. Пермь), составляющих 4 тонны в год.

Таблица 1.1.

Фармацевтические предприятия, выпускающие лекарственные препараты, содержащие ацетилсалициловую и салициловую кислоты

№ п/п	Фармацевтическое предприятие	Лекарственная форма
1	ОАО «Дальхимфарм»	Таблетки АСК, 500 мг
2	ОАО «Марбиофарм»	Таблетки АСК, 500 мг
3	ОАО «Ирбитский химико-фармацевтический завод»	Таблетки АСК, 500 мг
4	ОАО «Уралбиофарм»	Таблетки АСК, 500 мг
5	ОАО «Татхимфармпрепараты»	Таблетки АСК, 500 мг
6	ОАО «Синтез»	Ацекардол, 50 мг, 300 мг
7	АО «Акрихин»	Мазь «Акридерм»
8	ОАО «Биосинтез»	Цитрамон П таблетки (240 мг АСК)
9	ООО «Тульская фармацевтическая фабрика»	«Аквацитрамон» (360 мг АСК), салициловая мазь 2% салициловая паста 2%
10	ООО «Тверская фармацевтическая фабрика»	Раствор кислоты салициловой спиртовой 1%, 2%, Мазь салициловая 2%, Паста салицилово-цинковая 25 г
11	ОАО «Тюменский химико-фармацевтический завод»	Таблетки АСК, 500 мг
12	ОАО «Ярославская фармацевтическая фабрика»	Салицилово-цинковая паста 25г, Салициловая мазь 2%/3% 25г
13	ОАО «Московская фармацевтическая фабрика» (МосФарма)	Таблетки АСК, 500 мг
14	АО «Медисорб»	Таблетки АСК, 500 мг

Массовое производство и потребление АСК неизбежно приводит к попаданию данного соединения в объекты окружающей среды в качестве фармацевтического поллютанта. Проблема загрязнения окружающей среды фармацевтическими поллютантами (“*emerging pollutants*”, “*emerging contaminants*”) – высокостабильными соединениями с разнообразной химической структурой и выраженной биологической активностью особенно резко обозначилась в последние годы [68, 91, 93, 102, 110, 113, 125, 159, 160, 165, 166, 170, 172, 185, 193, 201]. ЛС и их метаболиты обнаруживаются в почве, донных осадках водоемов, поверхностных, сточных, грунтовых водах и даже питьевой воде [67, 71, 81, 87, 89, 98, 111, 119, 120, 129, 138, 156, 157, 167, 173, 176, 181, 186, 188, 192, 202].

Следует отметить, что появление интереса к проблеме загрязнения окружающей среды фармполлютантами связано с развитием хроматографических методов анализа – газовой хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием, которые позволяют определять широкий спектр ЛС в достаточно низких концентрациях [74, 75, 91, 102, 103, 108, 125, 127, 130, 146, 156, 159, 174].

Основные пути попадания лекарственных средств в окружающую среду представлены на рис. 1.3.

Как видно из рис. 1.3, лекарственные средства и их метаболиты после попадания на полигоны ТБО и в сточные воды могут вновь оказаться в питьевой воде и продуктах питания человека.

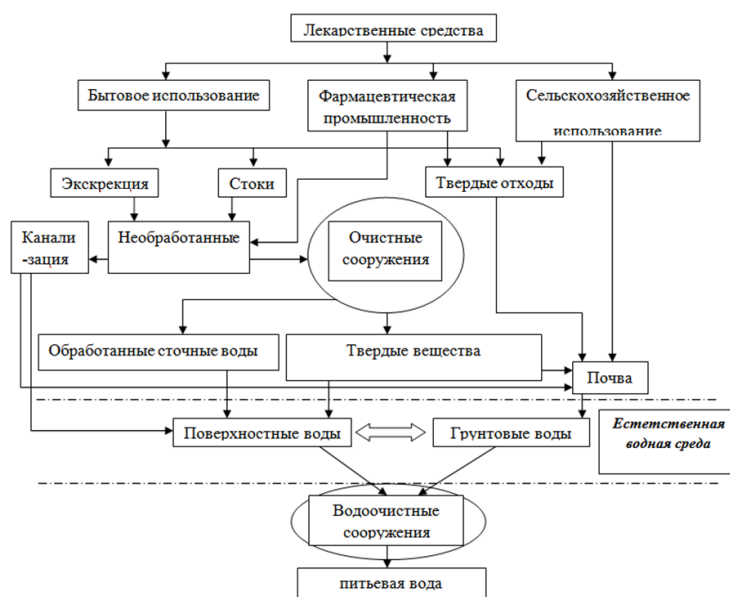


Рис. 1.3. Основные пути миграции лекарственных средств в окружающую среду.

Загрязнение окружающей среды фармполлютантами происходит на всех этапах жизни ЛС, от производства до применения и утилизации [23, 78, 142, 143, 144, 155, 162, 177, 179]. Оно обусловлено несовершенными методами утилизации фармацевтических отходов (сжигание, слив в промышленную канализацию, размещение на санитарных полигонах), а также несовершенством способов очистки сточных вод от фармполлютантов (озонирование, хлорирование, сорбирование углем и др.) [45, 115, 116, 124, 140, 202].

Присутствие фармполлютантов в окружающей среде является серьезной экологической проблемой вследствие наличия у данных веществ фармакологической активности и способности к аккумуляции [4, 56, 72, 73, 106, 118, 123, 171, 181, 182, 188, 195]. Следует отметить, что большинство фармацевтических субстанций являются чрезвычайно опасными (I класс) и высоко опасными (II класс) для окружающей природной среды [9, 175, 185, 195]. Фармацевтические субстанции АСК и СК относятся к I классу опасности (чрезвычайно опасные), а лекарственные формы – ко II классу опасности (высоко опасные) для окружающей природной среды [8, 9].

В последние годы АСК и ее метаболит СК детектированы в поверхностных, подземных, водопроводных и даже питьевых водах различных стран [4, 28, 166]. В настоящее время мало известно о долгосрочном воздействии низких концентраций этих веществ на живые организмы. Большинство данных о токсичности АСК основано на определении острой токсичности и кратковременной хронической токсичности [113, 122, 164]. В тестах на острую токсичность обычно используются высокие концентрации вещества, которые могут привести к нереалистичным эффектам. Так токсическая доза АСК для микроорганизмов может быть в диапазоне 37 – 1468 мг/л [150]. Поэтому данные способы исследования хронической токсичности салицилатов в окружающей среде неэффективны.

В. Nunes *et. al* смоделировал влияние СК на пресноводных рыб вида *Salmo trutta fario*. У подопытных рыб появилось несколько гистопатологических изменений с более высокой распространенностью и тяжестью поражений тканей по сравнению с контрольной группой. Наблюдаемые изменения были в основном структурными (пластинчатое слияние и гипертрофия) и воспалительными (эпителиальный лифтинг). Несколько рыб представили такие дегенеративные изменения, как аневризмы и некроз [113].

В связи с неблагоприятным воздействием салицилатов на живые организмы необходимы поиски способов очистки сточных вод от АСК и СК и уменьшения содержания уже находящихся в окружающей среде данных фармполлютантов. Возможность удаления салицилатов из сточных вод в промышленных условиях с помощью активного ила показал R. Dhulipala *et. al.* [110]. N. Hack *et. al.* продемонстрировал возможность микробной деградации салицилатов клетками *Pseudomonas fluorescens* в аэробных и анаэробных условиях по пути пирокатехина [82]. U. Guzik *et. al.* сообщил о способности *Stenotrophomonas maltophilia* деградировать пирокатехин, который является одним из возможных продуктов биодеструкции АСК [139].

J. Choudhary *et. al.* сообщил о способности 8 бактериальных штаммов, обнаруженных в почве Индии, к биодеструкции салицилатов в концентрации 0,05% [94].

Следует отметить, что в окружающей среде салицилаты могут подвергаться деградации под влиянием не только биотических, но и абиотических факторов, например, ультрафиолетового света [109]. Так, G. Wang *et. al.* смоделировал воздействие УФ спектра солнечного света на растворы СК в воде (0,00001 – 0,0001 %) и показал, что процесс деградации салицилатов описывается кинетическим уравнением псевдо-первого порядка. Факторами, ускоряющими данный процесс, являются низкое значение рН среды, наличие ионов кислорода, нитратов и нитритов [168].

1.5. Пути метаболизма ацетилсалициловой кислоты

Метаболиты АСК в организме человека хорошо изучены. При пероральном употреблении АСК деацетилируется на 50 – 80 % во время первого прохождения через печень. Образующаяся салициловая кислота связывается с глицином (до 75 %), образуя салицилмочевую кислоту. Небольшая часть СК (10%) соединяется с глюкуроновой кислотой, образуя ацильные и фенольные глюкурониды, которые выводятся через почки. Другая небольшая часть СК (около 10 %) окисляется до гентизиновой (2,5-дигидроксibenзойной) кислоты, которая также может соединяться с глицином, образуя гентисуровую кислоту (рис. 1.4.) [95].

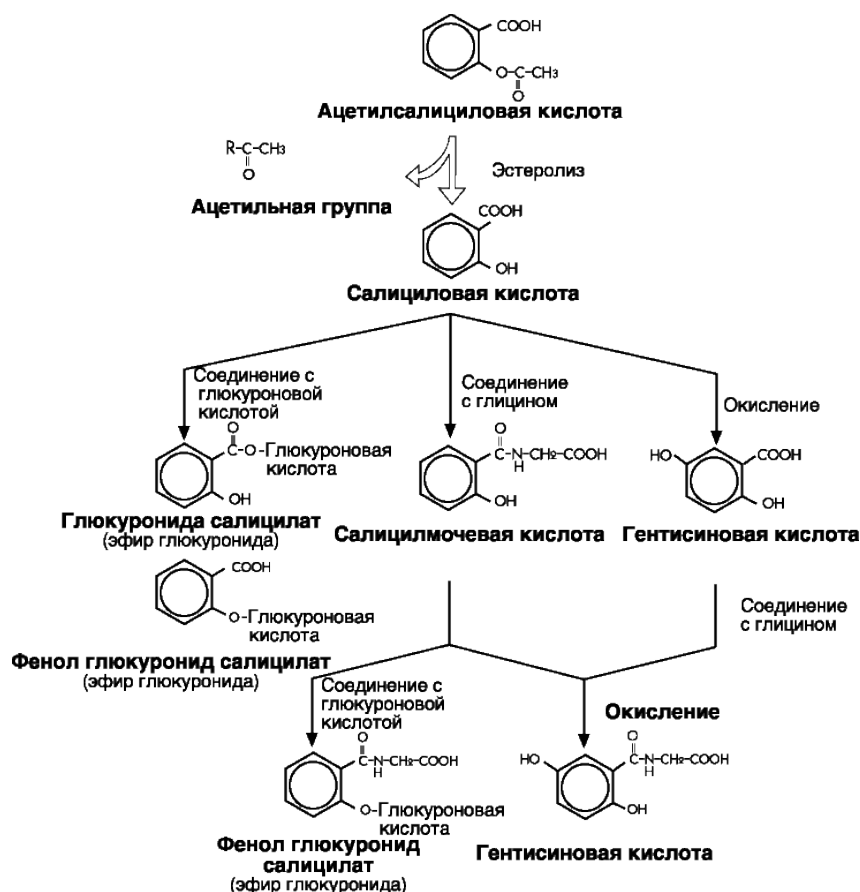


Рис. 1.4. **Метаболизм АСК в организме человека**

Цит. no: Chrastil J. et. al. [95].

В окружающей среде конъюгированные с СК формы метаболизируются до исходного вещества β -глюкуронидазами бактерий (*Escherichia coli*, например), а также ферментами некоторых видов рыб и моллюсков. Данные процессы являются основным фактором, способствующим присутствию СК (как метаболита АСК) в водных объектах окружающей среды [113].

Следует отметить, что в организме человека метаболизм АСК протекает без расщепления ароматического кольца (рис. 1.4). В отличие от человека и млекопитающих, микроорганизмы имеют набор ферментов, позволяющий расщеплять ароматическое кольцо салицилатов с последующей минерализацией образующихся продуктов [161, 163, 169]. Так P.F. Qi et. al. предложил два возможных пути деградации салицилатов грибами *Fusarium graminearum* (рис. 1.5) [114].

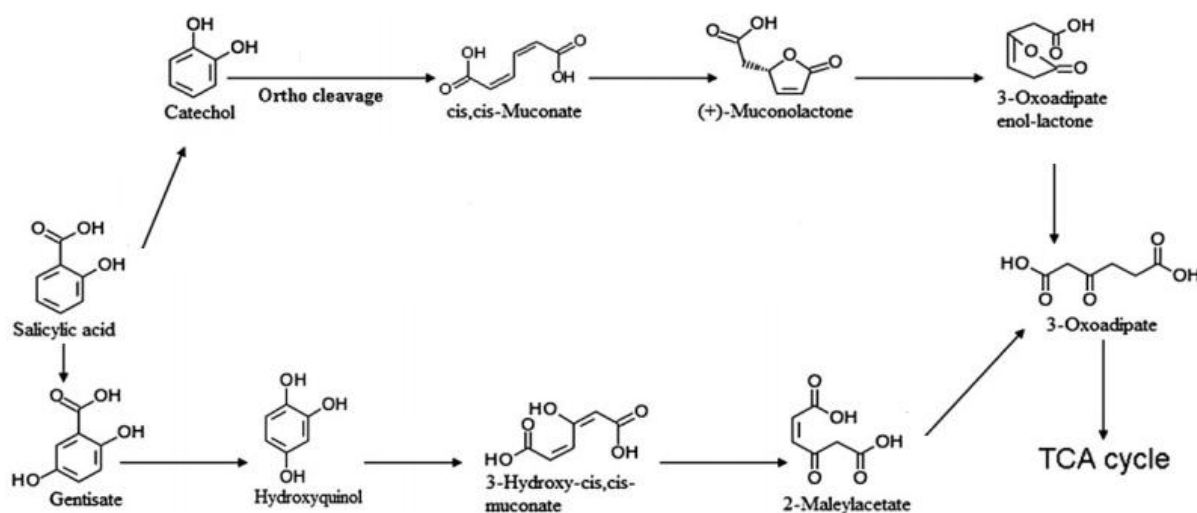


Рис. 1.5. Схема биодеструкции салицилатов грибами *Fusarium graminearum*.

Цит. no: P.F. Qi *et. al.* [114].

Как видно из приведенной схемы, биодеструкция СК может проходить по двум метаболическим путям. Первый путь: декарбоксилирование СК с образованием пирокатехина и последующее орто-расщепление его до цис, цис - муконовой кислоты. Последняя через стадии лактонов превращается в 3-оксоадипиновую кислоту, распадающуюся в цикле трикарбоновых кислот до неорганических продуктов. Второй путь: мета-гидроксилирование ароматического кольца СК с образованием гентиизиновой кислоты. Последняя посредством декарбоксилирования превращается в гидроксихинон, который в дальнейшем расщепляется до 3- гидрокси - цис, цис - муконовой кислоты, переходящей через стадию 2-малеилацетата в 3-оксоадипиновую кислоту.

М. Civilini *et. al.* показал возможность биодеструкции салицилатов клетками *Pseudomonas aeruginosa* по трем метаболическим путям, один из которых происходит с образованием fumarовой кислоты (рис. 1.6) [97].

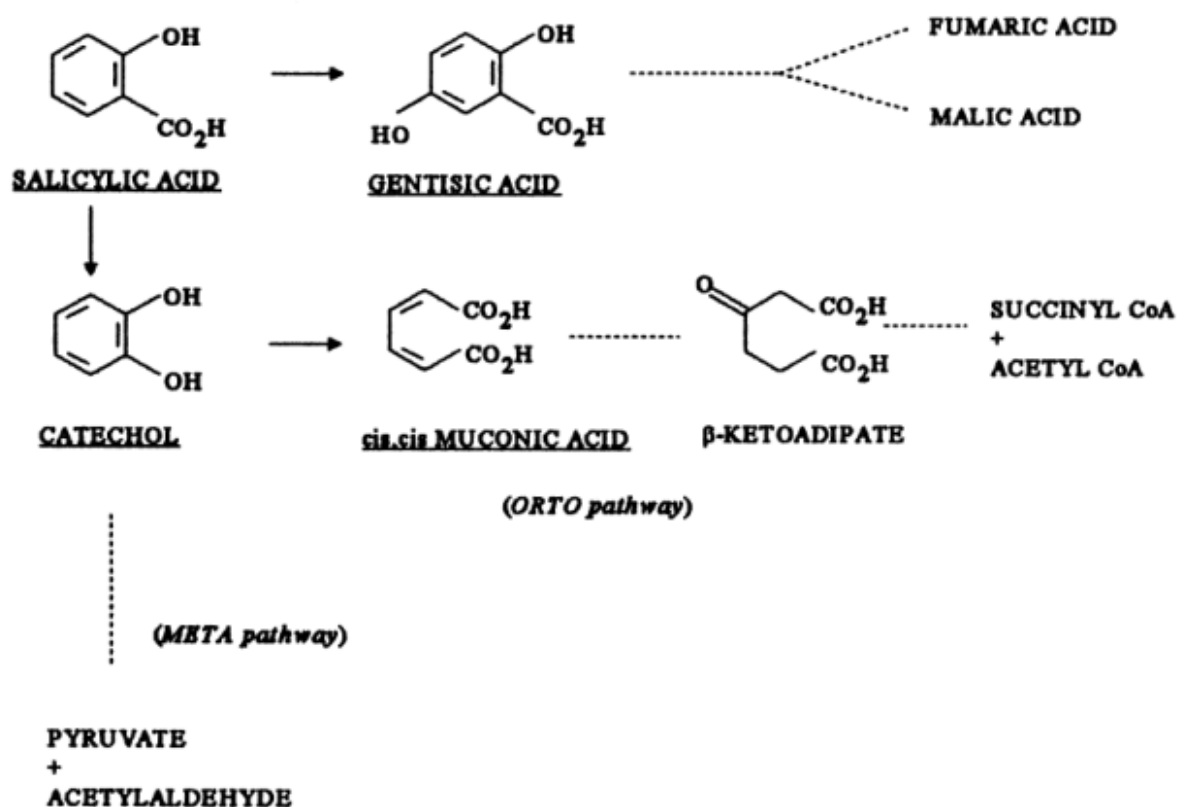


Рис. 1.6. Схема биодеструкции салицилатов клетками *Pseudomonas aeruginosa*.

Цит. no: M. Civilini *et. al.* [97].

Данная схема процесса биодеструкции салицилатов клетками псевдомонад аналогична схеме биодеградациии салицилатов грибами (рис. 1.5), однако отличается наличием третьего метаболического пути с образованием пировиноградной кислоты и ацетальдегида непосредственно из пирокатехина. D. Ishiyama *et. al.* показал возможность разложения салицилатов клетками *Streptomyces sp.* штамм WA46 по пути образования пирокатехина с последующим орто-расщеплением последнего до цис, цис-муконовой кислоты [141]. Бактериальное разложение пирокатехина до цис, цис-муконовой кислоты описано также в работе [79]. Биодегградация 2-гидроксибензоата либо по катехиновому, либо гентизатному пути показана в работе [152].

Таким образом, микроорганизмы способны расщеплять ароматическое кольцо салицилатов с образованием простых неароматических соединений.

1.6. Фумаровая кислота как метаболит ацетилсалициловой кислоты. Строение и свойства фумаровой кислоты.

Как показано выше (рис. 1.6), одним из возможных продуктов бактериального метаболизма АСК является фумаровая кислота [97]. Фумаровая кислота (CAS 110-17-8; транс-будендиовая кислота $\text{HO}_2\text{CCH}=\text{CHCO}_2\text{H}$) представляет собой транс - изомер янтарной кислоты. Фумаровая кислота находится во многих растениях, грибах, лишайниках (*Fumaria officinalis*) и встречается в небольших количествах во всех животных клетках, где она играет важную роль в качестве промежуточного продукта углеводного обмена, а также является промежуточным продуктом при биосинтезе аспарагиновой кислоты высшими растениями и бактериями. В цикле трикарбоновых кислот фумаровая кислота под действием фермента фумаразы присоединяет воду и превращается в яблочную кислоту (рис. 1.7).

Яблочная кислота под действием фермента малатдегидрогеназы окисляется в щавелевоуксусную с образованием никотинамида дениндинуклеотида (НАДН) (рис.1.6). А. Peksel *et al.* сообщили о том, что *Aspergillus niger* демонстрирует аналогичный цикл трикарбоновых кислот, содержащий фумаровую кислоту в качестве интермедиата [88].

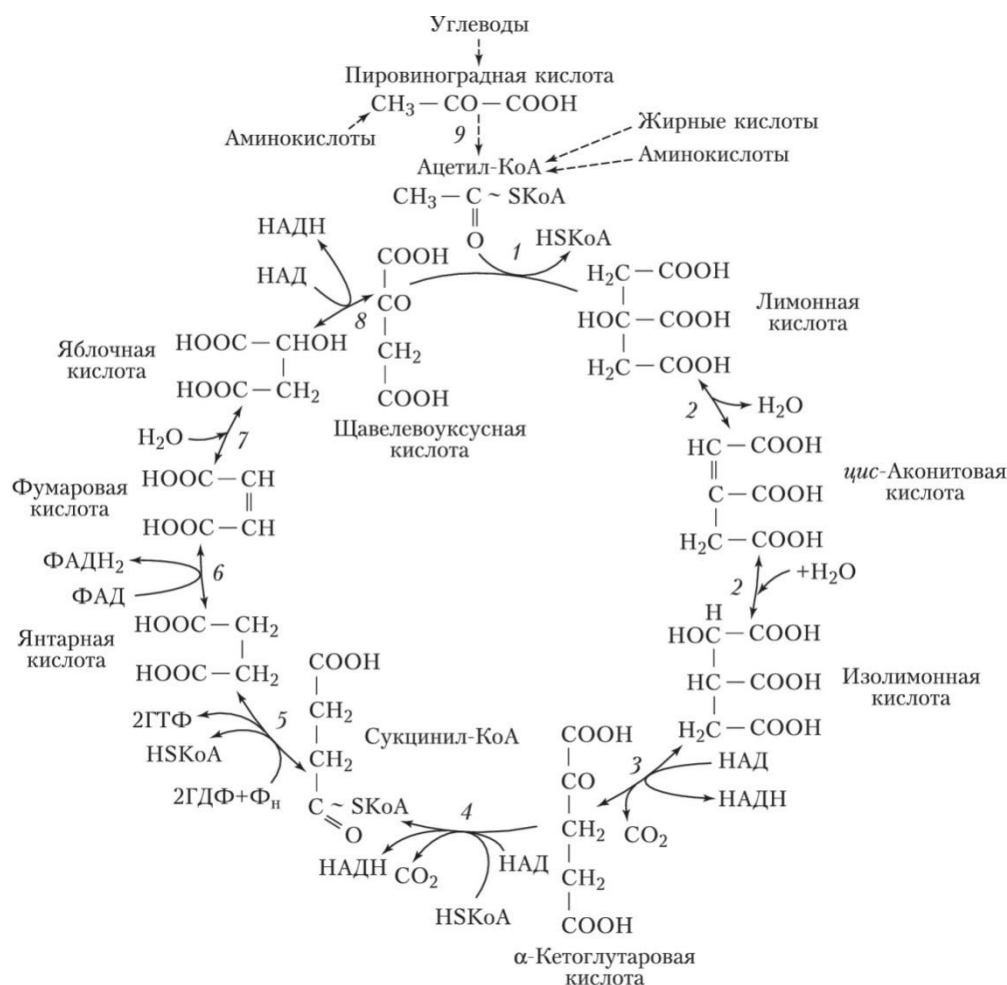


Рис. 1.7. Цикл трикарбоновых кислот.

Фумаровая кислота может проявлять фитостимулирующие свойства. Так, Мартынова Т.Н. с соавт. в своем патенте отмечают, что предпосевная обработка семян брюквы 1% раствором фумаровой кислоты повышает всхожесть, энергию прорастания семян и их урожайность [43]. Кропоткина В.В. сообщает, что обработка двудольных растений смесью органических кислот в концентрации 10^{-11} М, среди которых присутствует фумаровая кислота, увеличивает прирост сухой биомассы растений до 28% [27].

1.7. Методы анализа ацетилсалициловой кислоты и ее метаболитов

В соответствии с ГФ XIV издания, АСК в виде фармацевтической субстанции определяют алкалиметрическим методом в среде 96% этанола [14]. Однако данный метод не позволяет определять продукты метаболизма АСК, как и спектрофотометрический метод, предложенный J. Choudhary *et*

al. и T.R. Silva *et al.* для определения содержания СК в культуральных средах *Pseudomonas fluorescens* [94, 184].

Для обнаружения и количественного определения салицилатов и их метаболитов в биологических жидкостях и объектах окружающей природной среды используют хроматографические методы анализа: ВЭЖХ, ВЭЖХ/МС и ГХ/МС в частности [24, 47, 49, 82, 99, 107, 110, 136, 137, 152]. При этом важнейшей стадией является пробоподготовка анализируемого объекта. При подготовке биожидкостей часто применяют жидкость-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ). Так, R.C. Dolores *et al.* при определении АСК в плазме крови при ЖЖЭ в качестве экстрагента использовали ацетонитрил, а Кокорина Н.О. с соавт. – диэтиловый эфир [24, 99]. Поскольку в постферментационных средах бактерий содержится значительно меньшее (по массе) количество балластных веществ по сравнению с биологическими жидкостями человека и животных, то в отличие от методик пробоподготовки данных объектов Плотников А.Н. с соавт. использовали центрифугирование культуральной среды родококков при 10000 об/мин с последующей фильтрацией через мембранный фильтр [19, 41]. В качестве подвижной фазы при хроматографировании подготовленной пробы, содержащей АСК и ее метаболиты, используют либо кислые растворители (фосфатные буферные растворы, растворы фосфорной кислоты), либо подкисляют среду органическими кислотами (ледяной уксусной или муравьиной) [99, 107, 137, 154, 178, 187].

Для анализа продуктов микробиологической деструкции АСК и СК наиболее часто используют методы ГХ/МС и ВЭЖХ/МС. Так, M. Civilini *et al.* изучали продукты биодеструкции салицилатов клетками *Pseudomonas aeruginosa* методом ГХ/МС [97]. E. Grund *et al.* для анализа продуктов разложения нафталина, биодеструкция которого родококками происходит через стадию образования салицилата, использовал метод ВЭЖХ [131]. N. Hack *et al.* для анализа продуктов биодеструкции СК клетками *Pseudomonas fluorescens* также использовал метод ВЭЖХ [82]. P. Qi *et al.* предложил для

детекции продуктов биодеструкции СК в культуральных жидкостях грибов *Fusarium graminearum* метод ультраэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием (UPLC-ES/MS/MS) [114].

Выводы по главе 1

Таким образом, анализ литературных данных позволил сделать следующие выводы.

1. Массовое производство и потребление ацетилсалициловой кислоты неизбежно приводит к образованию значительного количества отходов и попаданию данного соединения в объекты окружающей среды.

2. Перспективным является поиск способов переработки фармацевтических отходов, содержащих ацетилсалициловую кислоту, в том числе микробиологических, с целью получения продуктов с новыми полезными свойствами.

2. Для количественного анализа ацетилсалициловой и салициловой кислот в биологических жидкостях используется метод ВЭЖХ.

3. Для идентификации и количественного определения продуктов деструкции ацетилсалициловой кислоты в биологических жидкостях и объектах окружающей среды используются методы ГХ/МС и ВЭЖХ/МС.

4. Возможным бактериальным метаболитом ацетилсалициловой кислоты является фумаровая кислота. В единичных публикациях отмечен факт фитостимулирующего действия данного вещества.

В связи с этим представляет интерес изучить пути метаболизма ацетилсалициловой кислоты актинобактериями рода *Rhodococcus*, химический состав и фитостимулирующую активность образующихся продуктов.

Глава 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной главе описаны объекты и методы исследования, использованные в работе приборы и реактивы.

2.1. Объекты исследования

1. АСК (2-ацетилоксибензойная кислота), фармацевтическая субстанция (Аньцю Луань Фармасьютикал Ко., Лтд., Китай). Соответствует требованиям ФС.2.1.0006.15 [14]. Содержание АСК в пересчете на сухое вещество не менее 99,5%.

2. Таблетки АСК (АО Медисорб, Россия) состава: АСК 0,5 г, крахмал картофельный 0,0237 г; тальк 0,0010 г; лактозы моногидрат (сахар молочный) 0,0240 г; повидон (поливинилпирролидон низкомолекулярный) 0,0003 г; кислота стеариновая 0,0010 г.

3. Продукты биодеструкции (ПБ) АСК клетками *R. jostii* ИЭГМ 60.

4. Фумаровая кислота (CAS: 110-17-8; транс-будендиовая кислота) SigmaAldrich, США. Содержание фумаровой кислоты $\geq 99,0\%$.

5. Зверобоя продырявленного трава *Hyperici perforati herba* ФС.2.5.0015.15 [15].

6. Тест-культура при определении фитотоксичности – семена овса посевного *Avena sativa* L. [11, 30].

7. Штаммы актинобактерий из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, номер 768 во Всемирной федерации коллекции культур, www.iegm.ru/iegmcol/strains), принадлежащих к *Gordonia rubriperctincta* (3 штамма), *R. erythropolis* (3 штамма), *R. opacus* (3 штамма), *R. qingshengii* (3 штамма), *R. ruber* (3 штамма), *R. jostii* (13 штаммов), всего 28 штаммов (табл. 2.1) [149].

Коллекционные штаммы, используемые в работе

Вид	Количество штаммов	Номер штамма
<i>R. erythropolis</i>	3	ИЭГМ 7 ¹ , ИЭГМ 11, ИЭГМ 180
<i>R. jostii</i>	13	ИЭГМ 28, ИЭГМ 29, ИЭГМ 30, ИЭГМ 31, ИЭГМ 32, ИЭГМ 33, ИЭГМ 60, ИЭГМ 68, ИЭГМ 458, ИЭГМ 508, ИЭГМ 550, ИЭГМ 589, ИЭГМ 1170
<i>R. ruber</i>	3	ИЭГМ 90, ИЭГМ 70 ¹ , ИЭГМ 77
<i>R. opacus</i>	3	ИЭГМ 56, ИЭГМ 261, ИЭГМ 716 ¹
<i>R. qingshengii</i>	3	ИЭГМ 1016, ИЭГМ 1270, ИЭГМ 247
<i>G. rubriperctincta</i>	3	ИЭГМ 129, ИЭГМ 111, ИЭГМ 95 ¹

Примечание. ИЭГМ – акроним Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов.

2.2. Материалы исследования**2.2.1. Материалы, использованные при проведении процесса биодеструкции ацетилсалициловой кислоты****Химические реактивы**

№ п/п	Наименование	Квалификация	Производитель	Нормативный документ
1	2	3	4	5
1.	Аммония сульфат	ч. д. а.	Россия	ГОСТ 3769-78 ГФ XIV, ч. 1, с. 1401
2.	Дикалия гидрофосфат	х.ч.	Россия	ГОСТ 2493-75; ГФ XIV, ч. 1, с. 1461
3.	Железа(III) хлорид	х.ч.	Россия	ГОСТ 4147-74 ГФ XIV, ч. 1, с. 1491

Продолжение таблицы 2.2

1	2	3	4	5
4.	Калия дигидрофосфат	х.ч.	Россия	ГФ XIV, ч. 1, с. 1509
5.	Калия нитрат	х.ч.	Россия	ГОСТ 4217-77 ГФ XIV, ч. 1, с. 1514
6.	Кальция хлорид безводный	х.ч.	Россия	ТУ 6-09-4711-81 ГФ XIV, ч. 1, с. 1523
7.	Магния сульфат гептагидрат	х.ч.	Россия	ГОСТ 4523-77 ГФ XIV, ч. 1, с. 1550
8.	Мясопептонный бульон	–	Охoid, Великобритания	–
9.	Мясопептонный агар	–	Охoid, Великобритания	–
10.	Натрия гидрокарбонат	х.ч.	Россия	ГФ XIV, ч. 3, с. 4414-4416
11.	Натрия хлорид	х.ч.	Россия	ГОСТ 4233-77 ГФ XIV, ч. 1, с. 1602
12.	Фосфатный буферный раствор рН 7,0	–	–	ГФ XIV, ч. 1, с. 1805
13.	Йоднитротетразолия хлорид	–	Sigma Aldrich, США	–

Таблица 2.3.

Оборудование

№ п/п	Наименование	Производитель
1	2	3
1.	Орбитальный шейкер CertomatIS (поддерживаемый температурный диапазон: от +6 до +60 °С)	Sartorius Stedim Biotech, Германия
2.	Спектрофотометр Lambda EZ 201	Perkon Elmer, США
3.	Дозаторы 100 мкл, 500 мкл, 1 мл	Sartorius, Германия
4.	Многоканальные дозаторы объемом 50 мкл, 100 мкл, 500 мкл, 1 мл.	Sartorius, Германия
5.	Центрифуга (12000 оборотов/мин)	Eppendorf, Германия
6.	Центрифуга(600 оборотов/мин)	Hermle Z200A, Германия
7.	Центрифужная пробирка 100 мл	Hermle, Германия
8.	Центрифужная пробирка 1 мл.	Eppendorf, Германия
9.	Мембранный фильтр НЦ 0,2 мкм	Владисарт, Россия
10.	Установка для стерильной фильтрации	Sartorius, Германия
11.	Магнитная мешалка (1400 оборотов/мин)	Heidolph, Германия
12.	Стерилизатор паровой ВК-75-01	Россия

2.2.2. Материалы, использованные при исследовании продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты

Таблица 2.4.

Химические реактивы

№ п/п	Наименование	Квалификация	Производитель	Нормативный документ
1	2	3	4	5
1.	Азотная кислота концентрированная	98,6%	Россия	ГОСТ 701-89 ГФ XIV, ч. 1, с. 1380

Продолжение таблицы 2.4

1	2	3	4	5
2.	Алюминия хлорид	х. ч.	Россия	ГФ XIV, ч. 1, с. 1386
3.	Алюминия хлорида спиртовый раствор 2 %	–	–	ГФ XIV, ч. 1, с. 1387
4.	Ацетон	х.ч..	Россия	ГФ XIV, ч. 1, с. 1412
5.	Ацетонитрил сорт 0 для хроматографии	о.х.ч.	Россия	ГФ XIV, ч. 1, с. 1413
6.	Гентизиновая кислота	х.ч.	Sigma Aldrich, США	–
7.	Гидрохинон	х.ч.	Sigma Aldrich, США	ГФ XIV, ч. 1, с. 1445
8.	2,2-Дифенил-1- пикрилгидразильный радикал (ДФПГ)	≥95%	Sigma Aldrich, США	–
9.	Железа (III) хлорида спиртовый раствор 1%	–	–	ГФ XIV, ч. 1, с. 1492
10.	Йод кристаллический	х.ч.	Россия	ГФ XIV, ч. 1, с. 1498
11.	Калия хлорид	х.ч.	Россия	ГОСТ 4234-77 ГФ XIV, ч. 1, с. 1519
12.	Калия хлорида раствор 0,1 М	–	–	ГФ XIV, ч. 1, с. 1520
13.	Метанол безводный	х.ч.	Россия	ГФ XIV, ч. 1, с. 1559
14.	Муравьиная кислота безводная	ч.д.а	Россия	ГФ XIV, ч. 1, с. 1579
15.	Натрия хлорид	х.ч.	Россия	ГФ XIV, ч. 1, с. 1602

Продолжение таблицы 2.4

1	2	3	4	5
16.	Пирокатехин	≥99%	Merck, Германия	ГФ XIV, ч. 1, с. 1626
17.	Рутин	х.ч.	Россия	ГФ XIV, ч. 1, с. 1644
18.	Фосфатный буферный раствор pH 3,0	–	–	ГФ XIV, ч. 1, с. 1798
19.	Фумаровая кислота	99%	Sigma Aldrich, США	–
20.	Уксусная кислота ледяная	ч.д.а.	Россия	ГФ XIV, ч. 1, с. 1707
21.	Спирт этиловый	96%	Россия	ГФ XIV, ч. 1, с. 1668
22.	Этилацетат	ч.д.а.	Россия	ГФ XIV, ч. 1, с. 1752
23.	Хлороформ	х.ч.	Россия	ГФ XIV, ч. 1, с. 1734
24.	Цис,цис-муконовая кислота	х.ч.	Acros organics, США	–

Таблица 2.5.

Оборудование

№ п/п	Наименование	Производитель
1	2	3
1.	Анализатор влажности MA-30	Sartorius, Германия
2.	Весы аналитические ViBRA	ООО ВИБРА РУС, Россия
3.	Вспомогательный хлорсеребряный электрод (ЭВЛ-1М3.1)	Антех, Белоруссия
4.	Жидкостной хроматограф LC Prominence 20A, оборудованный хроматографической колонкой с обращенно-фазным сорбентом Discovery® HS C18 (250x4,6 мм, 5 мкм) и диодно-матричным детектором (SPD-M20A)	Shimadzu, Япония

1	2	3
5.	Жидкостный хроматограф «LCMS - 8050», снабженный колонкой из нержавеющей стали (150*3,0 мм, Luna 3uC18(2) 100A) с обращенно – фазовым сорбентом и масс-спектрометрическим детектором типа тройной квадруполь с двойным источником ионизации	Shimadzu, Япония
6.	Индикаторный стеклянный электрод (ЭС-10601/7)	Антех, Белоруссия
7.	Иономер лабораторный И-160М	Антех, Белоруссия
8.	Сушильный шкаф Binder FD 115 (поддерживаемый температурный диапазон от 5°C ниже температуры окружающей среды до + 300°C)	Binder GmbH, Германия
9.	Спектрофотометр СФ 2000	ЗОМЗ, Россия
10.	Чашки Петри	Россия

2.2.3. Приготовление химических реактивов

Минерально-солевая среда RS. В мерную колбу вместимостью 1 дм³ помещали 2,0 г калия гидрофосфата (K₂HPO₄), 2,0 г калия фосфата однозамещенного (KH₂PO₄), 1,0 г калия нитрата (KNO₃), 2,0 г аммония сульфата ((NH₄)₂SO₄), 1,0 г натрия хлорида (NaCl), 0,20 г магния сульфата (MgSO₄×7H₂O), 0,0151 г кальция хлорида безводного (CaCl₂), 0,001 г железа(III) хлорида (FeCl₃×7H₂O) и растворяли в воде очищенной, доводя объем колбы водой до метки.

Фосфатный буферный раствор (pH 7,0): 28,4 г динатрия гидрофосфата безводного и 18,2 г калия дигидрофосфата растворяли в воде и довели объем раствора водой до 500,0 см³ [12].

Фосфатный буферный раствор (pH 3): 0,7 мл фосфорной кислоты концентрированной смешивали с 100 см³ воды и довели объем раствора водой до 900 см³. Устанавливали значение pH = 3,0 с помощью раствора натрия гидроксида концентрированного и довели объем раствора водой до 1000,0 см³ [12].

2.3. Методы исследования

2.3.1. Определение минимальной подавляющей концентрации ацетилсалициловой кислоты в отношении алканотрофных микроорганизмов

Определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) АСК в отношении бактериальных культур проводили методом двукратных серийных разведений с использованием полистироловых планшетов стандартной конфигурации 8x12 (96) лунок. АСК вносили в минерально-солевую среду RS из стерильного концентрированного раствора (40 г/л) до конечной концентрации 0,07 г/л.

Методика приготовления стерильного концентрированного раствора АСК: в коническую колбу вместимостью 250 см³ помещали 100 см³ минерально-солевой среды RS, 4,0000 г (точная масса) АСК и 3,7280 г гидрокарбоната натрия (эквивалентное АСК количество), закрывали ватно-марлевой пробкой и стерилизовали в паровом стерилизаторе (P=1 атм, t=2 часа).

Бактериальные клетки (инокулят) вносили в среду RS с АСК в концентрации $2,3 \times 10^7$ клеток/мл. Клетки предварительно инкубировали в течение 5-ти сут в мясopептонном бульоне (Oxoid, Великобритания) и дважды отмывали фосфатным буферным раствором (pH 7,0).

Жизнеспособность бактериальных клеток определяли специфическим окрашиванием бактерий йодонитротетразолиум хлоридом (Sigma-Aldrich, США).

2.3.2. Биологическая деструкция ацетилсалициловой кислоты

Биодеструкцию АСК проводили на базе лаборатории алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (Пермь). В колбу Эрленмейера вместимостью 250 см³ вносили 0,0100 – 0,0500 г АСК, либо 0,2500 г АСК с добавлением эквивалентного количества гидрокарбоната натрия (0,2330 г), 100 см³ минерально-солевой среды RS и инокулят (взвесь клеток родококков) в концентрации $3,8 \times 10^7$ клеток/см³.

Клетки родококков предварительно выращивали в течение пяти сут на мясопептонном бульоне и дважды отмывали 10 mM K-Na-фосфатным буферным раствором (рН 7,0). Биодеструкцию АСК проводили в условиях периодического культивирования на орбитальном шейкере CetromatIS (Sartorius Stedim Biotech, Германия) при 160 об/мин и 28 °С в течение 4 – 30 сут.

2.3.3. Плоскостная (тонкослойная) хроматография

Идентификацию ПБ АСК методом ТСХ проводили на пластинах «Сорбфил» ПТСХ-П-В-УФ (ЗАО «Сорбполимер», Россия). Объем анализируемых проб и стандартных растворов составлял 10 мкл. В качестве последних использовали этанольные растворы АСК либо салицилата натрия и предполагаемых ПБ АСК: пирокатехина («Merck», Германия), *цис,цис*-муконовой кислоты (Acrosorganics, США), гидрохинона («Merck», Германия), гентизиновой (Sigma Aldrich, США) и фумаровой кислот (Sigma Aldrich, США) в концентрации 10 мг/мл. Для обнаружения исследуемых веществ использовали облучение УФ светом при длине волны 254 нм.

2.3.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Содержание АСК в постферментационных средах родококков определяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в лаборатории хроматографических методов анализа ПГФА с использованием жидкостного хроматографа LC Prominence 20A (Shimadzu, Япония) в комплектации: насос LC-20AD, детектор SPD-M20A, термостат колонок СТО-20АС, мембранный дегазатор DGU-20A₃, системный контроллер СВМ-20А, автодозатор Sil-20А. Хроматографическое разделение веществ проводили при 40°С на колонке Luna 5uC18(2) 100A (4,6 mm×250 mm) (Phenomenex). Регистрацию и обработку хроматографической информации проводили с помощью программы LC solution (version 1, 25 rus). Расчет содержания АСК в постферментационной среде проводили по формуле:

$$C_x = \frac{S_x \times C_o}{S_o}$$

S_x – площадь пика АСК в постферментационной среде,

S_o – площадь пика АСК в растворе стандартного образца,

C_o – концентрация АСК в растворе стандартного образца.

2.3.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием

Определение содержания фумаровой кислоты в составе ПБ АСК в постферментационных средах родококков проводили методом обращенно-фазовой тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии в лаборатории хроматографических методов анализа ПГФА с использованием жидкостного хроматографа LCMS-8050 (Shimadzu, Япония) под руководством к.ф.н., доц. Карпенко Ю.Н. Хроматографическое разделение веществ проводили при 40°C на колонке из нержавеющей стали (150*3,0 мм, Luna 3uC18(2) 100A) с обращенно – фазовым сорбентом и масс-спектрометрическим детектором типа тройной квадруполь с двойным источником ионизации (электроспрей ESI и химическая ионизация при атмосферном давлении APCI). Регистрацию и обработку хроматографической информации проводили с использованием программы LC solution (version 1, 25 rus).

Расчет содержания фумаровой кислоты в постферментационной среде проводили по формуле [1]:

$$C_x = \frac{S_x \times C_o}{S_o}$$

S_x – площадь пика фумаровой кислоты в постферментационной среде,

S_o – площадь пика фумаровой кислоты в растворе стандартного образца,

C_o – концентрация фумаровой кислоты в растворе стандартного образца.

2.3.6. Антиоксидантная активность продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты. ДФПГ – метод

Антиоксидантную активность ПБ АСК определяли с использованием ДФПГ – радикала по модифицированной нами методике [100].

Постферментационную среду родококков, полученную по окончании процесса биодеструкции АСК (0,25%), в количестве 200 см³ упаривали под вакуумом до получения сухого остатка массой 1,8000 г, содержащего 0,156 г ПБ АСК и 1,644 г компонентов среды RS. Из полученного сухого остатка готовили водные растворы с концентрацией ПБ АСК 1500, 3800, 4500 и 4800 мкг/мл. В качестве эталона сравнения использовали водные растворы аскорбиновой кислоты в концентрации 5, 8, 10 мкг/мл. К 1 см³ раствора ПБ АСК вышеуказанной концентрации прибавляли 2 см³ раствораДФПГ (60 мкг/мл) в спирте этиловом 95%, смесь центрифугировали и измеряли оптическую плотность полученного раствора через 30 мин на спектрофотометре СФ 2000 (Россия) при длине волны 517 нм и толщине слоя 1 см. В качестве контроля использовали раствор, состоящий из 2 см³ раствораДФПГ (60 мкг/мл) и 1 см³ воды очищенной. Антиоксидантную активность выражали в г-экв аскорбиновой кислоты /1 г ПБ АСК.

2.3.7. Острая токсичность

Исследование острой токсичности ПБ АСК проводили на белых нелинейных мышах обоего пола массой 24–30 г на кафедре физиологии ПГФА под руководством к.м.н., доц. Рудаковой И.П. Для определения средней летальной дозы использовали экспресс-метод В.В. Прозоровского с соавт. [46]. Постферментационные среды родококков объемом 200 см³, содержащие ПБ АСК в суммарной теоретической концентрации 2,5 мг/мл, упаривали на водяной бане до объема 5 мл и, соответственно, концентрации ПБ 100 мг/мл. Введение животным ПБ АСК осуществляли перорально в объеме 1 мл в четырех дозах: 2000, 2500, 3160 и 3980 мг на 1 кг массы тела, которые рассчитывали, исходя из ЛД₅₀ АСК (контроль), равной 1410,0 мг/кг [25]. Каждой паре животных вводили одну дозу в порядке ее возрастания. Наблюдение за мышами проводили в течение 7 суток. На основании полученного значения LD₅₀ при P=0,05 определяли класс токсичности продуктов биодеструкции АСК по классификации К.К. Сидорова [52].

2.3.8. Класс опасности для окружающей природной среды

Для определения класса опасности ПБ АСК для окружающей природной среды использовали методику расчетов, утвержденную приказом Минприроды России от 04.12.2014 № 536 [38].

2.3.9. Фитотоксичность

Фитотоксичность ПБ АСК определяли в соответствии с Методическими рекомендациями и ГОСТ [11, 30]. В качестве тест-культуры использовали семена овса посевного *Avena sativa* L., всхожесть которых составляла 98% [30]. Процент всхожести определяли по истечении 3 суток в результате проращивания семян в чашках Петри с фильтровальной бумагой, куда вносили очищенную воду в объеме 5 см³. При определении фитотоксичности ПБ АСК семена овса посевного помещали в чашки Петри по 25 штук в каждую и проращивали между двумя слоями фильтровальной бумаги, смоченной соответствующей жидкостью: 1) раствором АСК 0,25% в среде RS, нейтрализованным эквивалентным количеством гидрокарбоната натрия; 2) ПБ АСК, отобранными на конечном этапе процесса биодеструкции; 3) раствором фумаровой кислоты 0,0005%; 0,015%; 0,05%. (рис. 2.1). Для увлажнения контрольной группы семян использовали воду очищенную. Первоначальный объем раствора, введенный в каждую чашку Петри, составлял 15,0 см³. Для каждого проростка определяли максимальную длину корня на 7-е сутки роста.

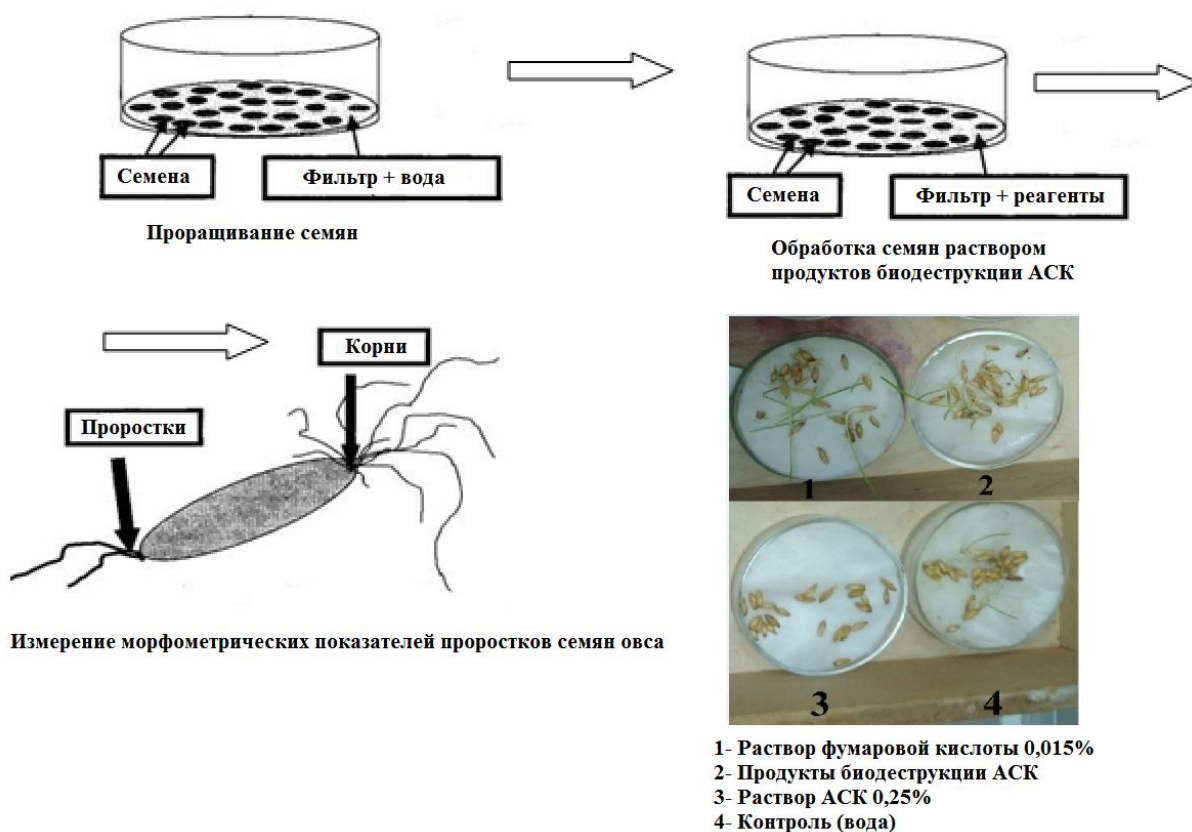


Рис. 2.1. Схема определения фитотоксичности ПБ АСК

Статистическую обработку результатов проводили с использованием F-критерия Фишера и t-критерия Стьюдента. Различия между выборками признавали статистическими значимыми при $t > t_{кр}$.

2.3.10. Фитостимулирующее действие продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты на зверобой продырявленный

Исследование действия ПБ АСК и фумаровой кислоты на растущую траву зверобоя продырявленного *Hypericum perforatum* L. проводили на территории Ботанического сада имени А.Г. Генкеля Пермского государственного национального исследовательского университета в мае-сентябре 2018 г. Три площадки (1 опытная и 2 контрольных) площадью 2×2 м² каждая были засеяны семенами зверобоя продырявленного (агрофирма «Аэлита», Россия) в количестве 0,2 г на площадку (рис. 2.2).



Рис. 2.2. Схема исследования фитостимулирующего действия ПБ АСК в полевых условиях

Каждая площадка обрабатывалась с периодичностью в 2 недели соответствующим агентом: ПБ АСК, раствором фумаровой кислоты 0,015% и водой. В начале сентября 2018 г. растения извлекали из почвы, траву зверобоя продырявленного высушивали воздушно-теневым способом и использовали для определения содержания в ней флавоноидов.

Содержание суммы флавоноидов в высушенной траве зверобоя продырявленного определяли спектрофотометрическим методом на основе реакции с алюминия хлоридом при длине волны 415 нм [15]. Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D \times V_{\text{м.к.1}} \times V_{\text{м.к.2}} \times 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \times a \times V_{\text{пип}} \times (100 - W)}$$

X – содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин на абсолютно сухое сырьё, масс. %;

D – оптическая плотность испытуемого раствора, отн. ед.;

$V_{\text{м.к.1}}$ – объем мерной колбы для приготовления раствора А, см³ (100,00 см³);

$V_{\text{м.к.2}}$ – объем мерной колбы для приготовления анализируемого раствора, см³ (25,00 см³);

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса РСО рутина с алюминия хлоридом при длине волны 415 нм ($E_{1\text{см}}^{1\%} = 248$);

a – масса сухой травы зверобоя продырявленного, г (1,0000 г);

$V_{\text{тип}}$ – объем аликвоты раствора А для приготовления анализируемого раствора, см^3 (1,00 см^3);

W – потеря в массе сырья при высушивании сырья, %.

Определение влажности растительного сырья осуществляли по методике [13]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием F -критерия Фишера и t -критерия Стьюдента. Различия между выборками признавали статистическими значимыми при $t > t_{\text{кр}}$.

2.3.11. Кинетическое моделирование процесса биодеструкции ацетилсалициловой кислоты

Для сравнительного анализа скорости процесса биодеструкции АСК в виде фармацевтической субстанции и таблеток использовали кинетическое уравнение первого порядка $dx/dt = -k x$ с начальным условием $x_0 = 100\%$ при $t = 0$ [29].

Глава 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В ПОСТФЕРМЕНТАЦИОННЫХ СРЕДАХ РОДОКОККОВ МЕТОДОМ ВЭЖХ

В данной главе представлены результаты скрининга активного штамма-биодеструктора ацетилсалициловой кислоты, а также результаты разработки методики определения содержания АСК в посферментационной среде родококков методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. С использованием математического моделирования изучено влияние начальной концентрации АСК и вспомогательных веществ таблеток на продолжительность, скорость процесса биодеструкции и период полураспада АСК.

3.1. Определение жизнеспособности актинобактерий в отношении ацетилсалициловой кислоты

По нашим данным, все использованные в работе коллекционные штаммы актинобактерий *Rhodococcus* и *Gordonia* сохраняли жизнеспособность в присутствии АСК в диапазоне концентраций от 0,62 до 20 г/л. Для родококков показатели МПК в отношении АСК оказались значительно выше (до 20 г/л) по сравнению с таковыми для гордоний (табл. 3.1).

Таблица 3.1.

Минимальная подавляющая концентрация АСК в отношении актинобактерий

Лекарственное средство	МПК, г/л	
	<i>Rhodococcus</i> (25 штаммов)	<i>Gordonia</i> (3 штамма)
АСК	0,62–20,0	2,5

Таблица 3.2.

**Минимальная подавляющая концентрация АСК
в отношении актинобактерий рода *Rhodococcus***

Вид	Количество штаммов	МПК, г/л
<i>R. qingshengii</i>	3	2,5 – 5
<i>R. ruber</i>	3	1,25 – 5
<i>R. erytopolis</i>	3	0,62 – 2,5
<i>R. opacus</i>	3	1,25 – 5
<i>R. jostii</i>	3	2,5 – 20

Как видно из табл. 3.2, представители вида *R. jostii* характеризовались наиболее выраженной устойчивостью по отношению к АСК (МПК от 2,5 до 20 г/л). Поэтому для дальнейшего скрининга были использованы коллекционные штаммы, принадлежащие к этому виду родококков.

Таблица 3.3.

**Минимальная подавляющая концентрация АСК
в отношении коллекционных культур *R. jostii***

№	<i>R. jostii</i> ИЭГМ	МПК, г/л
1	28	20
2	29	0,6
3	30	0,6
4	31	40
5	32	1,25
6	33	20
7	60	40
8	68	0,3
9	458	20
10	508	2,5
11	550	20
12	589	40
13	1170	20

Примечание. ИЭГМ – акроним Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов.

Как видно из табл. 3.3, большинство из исследованных штаммов *R. jostii* характеризуется выраженной устойчивостью в отношении АСК (МПК от 20 до 40 г/л). Высоко устойчивыми (МПК 40 г/л) оказались штаммы *R. jostii* ИЭГМ 31, *R. jostii* ИЭГМ 60 и *R. jostii* ИЭГМ 589.

3.2. Исследование деструктирующей активности родококков в отношении ацетилсалициловой кислоты

Биодеструктирующую активность данных штаммов в отношении АСК определяли по скорости убыли исходного субстрата из среды культивирования родококков, которую оценивали методом ВЭЖХ. Продолжительность процесса биодеструкции АСК (2,5 г/л) клетками родококков представлена в табл.3.4.

Таблица 3.4.

Биодеструктирующая активность родококков в отношении АСК

Коллекционный штамм	Продолжительность процесса биодеструкции АСК, сут
<i>R. jostii</i> ИЭГМ 31	> 30
<i>R. jostii</i> ИЭГМ 60	9
<i>R. jostii</i> ИЭГМ 589	10

Как видно из табл. 3.4, продолжительность процесса биодеструкции АСК клетками *R. jostii* ИЭГМ 60 и *R. jostii* ИЭГМ 589 составляет 9 и 10 суток соответственно, в отличие от *R. jostii* ИЭГМ 31, с использованием которого процесс разложения АСК идет крайне медленно (более 30 суток). Следует отметить, что в процессе биодеструкции АСК родококками *R. jostii* ИЭГМ 60 и *R. jostii* ИЭГМ 589 наблюдалось выраженное увеличение клеточной концентрации более чем в 100 раз (с $2,1 \cdot 10^7$ до $3,5 \cdot 10^9$ клеток/мл и с $2,3 \cdot 10^7$ до $3,4 \cdot 10^9$ клеток/мл соответственно). Это является подтверждением того факта, что данные штаммы способны к биодеструкции АСК в качестве единственного источника углерода, и позволяет считать штаммы *R. jostii* ИЭГМ 60 и *R. jostii* ИЭГМ 589 наиболее активными в отношении АСК [63].

Поскольку *R. jostii* ИЭГМ 60 (http://www.iegм.ru/iegмcol/strains/rhodoc/jostii/r_jostii60.html) осуществляет биодеструкцию АСК за меньшее время по сравнению с *R. jostii* ИЭГМ 589, то данный штамм был выбран в качестве биодеструктора АСК в дальнейших экспериментах. Характеристика данного штамма представлена в табл. 3.5.

Характеристика штамма *R. jostii* ИЭГМ 60

Коллекционный штамм	Источник выделения	Биотехнологический потенциал
<i>R. jostii</i> ИЭГМ 60	Нефтезагрязненные почвы, нефтяные месторождения; Украина	Трансформация тиоанизола, способность использовать пропан и н-углеводороды в качестве единственного источника углерода; вырабатывает биосурфактанты при выращивании на н-алканах (C10-C16); устойчив к Mo^{6+} (5,0 мМ).

Следует отметить, что актинобактерии рода *Rhodococcus* являются устойчивыми обитателями загрязненных почв, водоемов, активных илов, сточных вод, обладают высокой активностью оксидоредуктаз и богатыми адаптивными возможностями в отношении различных токсических соединений, в том числе ЛС [135, 148, 151, 180, 190, 199, 200].

3.3. Разработка методики и определение остаточного содержания ацетилсалициловой кислоты в процессе биодеструкции

Поиск условий количественного определения АСК в постферментационных средах родококков предполагал разработку методики анализа, позволяющей оценить содержание АСК и СК при совместном присутствии в образующейся многокомпонентной системе и степень биодеструкции АСК родококками.

3.3.1. Выбор оптимальных хроматографических условий количественного анализа ацетилсалициловой кислоты в постферментационных средах родококков

Образцы культуральных жидкостей родококков, содержащие АСК, продукты ее биодеструкции, продукты жизнедеятельности бактериальных клеток и составляющие минеральной среды RS, представляли собой сложные многокомпонентные системы. В связи с этим выбор оптимальных условий определения АСК в данных системах осуществляли с учетом параметров, влияющих на хроматографическое разделение присутствующих компонентов: природа неподвижной фазы, рН подвижной фазы, содержание

ацетонитрила в элюенте и режим элюирования. Разделение АСК, СК и других компонентов постферментационной среды проводили на колонке, упакованной обращенно-фазовым сорбентом на основе силикагеля, модифицированного фазой С18 (размер частиц сорбента 5 мкм). В качестве подвижных фаз использовали смеси ацетонитрила и фосфатного буферного раствора (рН 3) в соотношениях 1:9; 2:8; 3:7; 4:6; 5:5 и 6:4. Хроматографирование проводили в изократическом режиме со скоростью потока элюента 0,8 – 1,3 мл/мин.

Наиболее приемлемым в плане эффективности разделения компонентов пробы явился элюент: ацетонитрил – фосфатный буферный раствор (рН 3,0) в соотношении 3:7. Данный состав подвижной фазы обеспечивает четкое разделение пиков АСК, продуктов её деградации и других компонентов культуральной жидкости при использовании изократического режима элюирования. Отказ от градиентного режима, наиболее часто применяемого при анализе многокомпонентных систем, позволил оптимизировать методику по времени.

Для детектирования АСК и СК были выбраны длины волн 227 и 236 нм, соответствующие максимумам поглощения данных веществ (рис. 3.1).

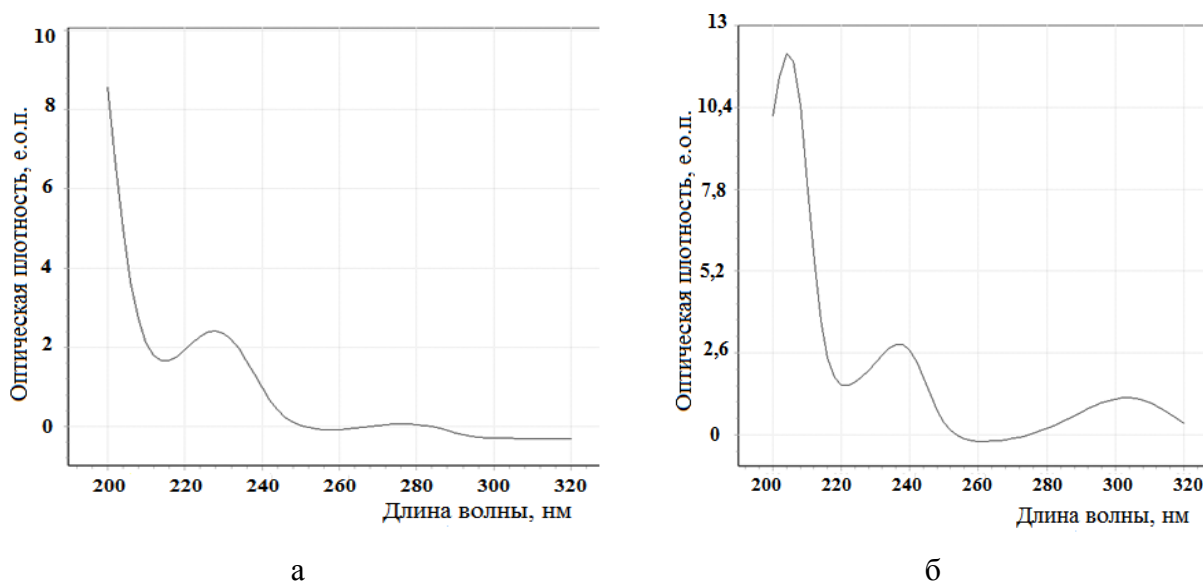


Рис. 3.1. УФ спектры АСК (а) и СК (б) в подвижной фазе ацетонитрил – фосфатный буферный раствор (рН 3,0) в соотношении 3:7

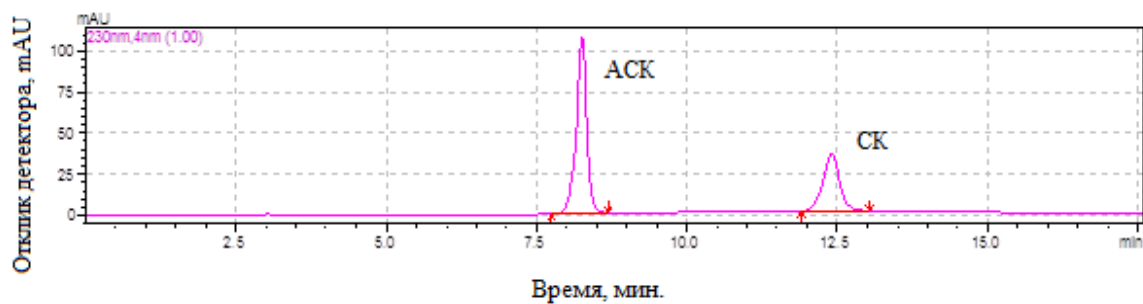
Таким образом, в качестве оптимальных выбраны следующие условия хроматографического определения АСК и продукта ее гидролиза СК в культуральных средах родококков: подвижная фаза ацетонитрил – фосфатный буферный раствор (рН 3,0) в соотношении 3:7, скорость потока элюента – 1 мл/мин, температура колонки – 40°C, объем вводимой пробы – 10 мкл, длины волн детектирования – 227 и 236 нм. В данных условиях время удерживания составило для АСК и СК 8,25 мин и 12,30 мин соответственно.

3.3.2. Валидация методики количественного определения ацетилсалициловой кислоты в постферментационных средах родококков

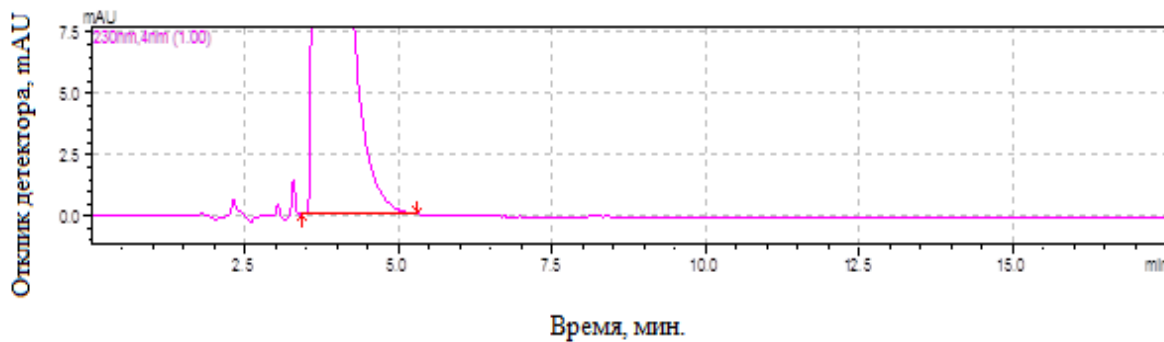
Валидацию разработанной биоаналитической методики проводили в соответствии с требованиями Center for Drug Evaluation and Research U.S. Food and Drug Administration [FDA] (2001) и European Medicines Agency [EMA] (2009) по показателям специфичность, линейность, прецизионность, правильность, предел обнаружения и предел количественного определения [132, 133].

3.3.3. Определение специфичности (селективности) методики

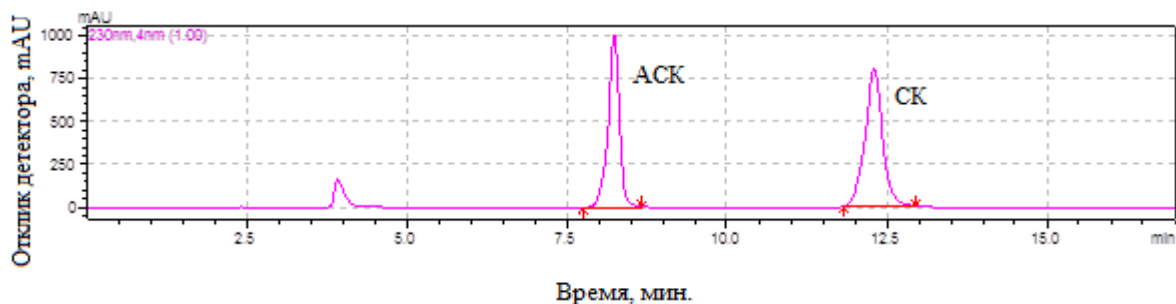
Специфичность выбранных хроматографических условий оценивали посредством анализа смеси 0,025 % стандартных растворов АСК и СК в воде, среды культивирования родококков RS, смеси 0,25 % растворов АСК и СК в среде RS, а также образца культуральной жидкости родококков на 2-е сут процесса биодеструкции АСК в начальной концентрации 0,03 % (рис. 3.2).



а



б



в



г

Рис. 3.2. Хроматограммы 0,025% стандартных растворов АСК и СК в воде (а), среды культивирования родококков RS (б), 0,25% растворов АСК и СК в среде RS (в), образца постферментационной среды на 2-е сут процесса биодеструкции АСК (г)

Время удерживания АСК и СК в среде RS (рис. 3.2 в) и постферментационной среде родококков (рис. 3.2 г) совпадало с соответствующим временем удерживания аналитов в стандартных водных растворах (рис. 3.2 а). Установлено отсутствие мешающего влияния посторонних хроматографических пиков компонентов среды RS (рис. 3.2 б) и продуктов биодеструкции на определение АСК и СК в постферментационной среде родококков.

3.3.4. Нижний предел количественного определения ацетилсалициловой кислоты

Нижний предел количественного определения (НПКО) является минимальной концентрацией аналита в образце, которую можно надежно определить с приемлемой правильностью и прецизионностью.

Нижний предел количественного определения АСК и СК подбирали с учетом чувствительности используемого метода и величины фоновых шумов. Готовили по 6 образцов модельных смесей АСК и СК в среде RS в концентрации 0,0001% и проводили анализ в соответствии с условиями разработанной методики. Для каждого образца рассчитывали относительное стандартное отклонение (RSD, %) (табл. 3.6, 3.7).

Таблица 3.6.

Оценка НПКО ацетилсалициловой кислоты

Концентрация АСК в модельной смеси, %	Определено, %	\bar{x} (n = 6)	SD	RSD, %
0,0001	0,00012	0,000105	0,000015	14,28
	0,00011			
	0,00009			
	0,00011			
	0,00012			
	0,00008			

Оценка НПКО салициловой кислоты

Концентрация СК в модельной смеси, %	Определено, %	\bar{x} (n = 6)	SD	RSD, %
0,0001	0,00009	0,000095	0,000015	14,78
	0,00009			
	0,00011			
	0,00011			
	0,00008			
	0,00008			

НПКО АСК и СК для разработанной методики составил 0,0001 %. Полученное относительное стандартное отклонение, равное 14,28% и 14,78%, приемлемо для биоаналитических методик [132, 133].

3.3.5. Установление линейности методики

В соответствии с требованиями к определению валидационных характеристик аналитических методик отклик прибора в отношении концентрации аналита должен быть известен и оцениваться в определенном диапазоне концентраций [132]. При построении градуировочного графика необходимо использовать минимум шесть калибровочных стандартов разного концентрационного уровня. При этом каждый стандарт следует анализировать дважды [132, 133]. В связи с этим для установления линейности методики был проведен анализ 12 образцов модельных смесей среды RS с содержанием АСК и СК в диапазоне концентраций от 0,0001 % до 0,25 %. Каждый образец готовили к анализу в соответствии с методикой пробоподготовки и хроматографировали 2 раза. Результаты определения линейности приведены в табл. 3.8, 3.9 и на рис. 3.3, 3.4.

Таблица 3.8.

Зависимость площади пика от концентрации АСК в среде RS

Концентрация АСК, %	Площадь хроматографического пика (S), Au*мкл (средний результат 2-х параллельных измерений)
0,25	59442077
0,2	47726102
0,15	35240555
0,125	30077946
0,1	24747872
0,05	13034337
0,025	6562539
0,0125	3274921
0,005	1282812
0,001	247563
0,0005	123507
0,0001	23041

Таблица 3.9.

Зависимость площади пика от концентрации СК в среде RS

Концентрация СК, %	Площадь хроматографического пика (S), Au*мкл (средний результат 2-х параллельных измерений)
0,25	73811832
0,2	62158970
0,15	47299737
0,125	41121004
0,1	33973375
0,05	17712200
0,025	8846947
0,0125	4404280
0,005	1737605
0,001	340082
0,0005	168990
0,0001	32863

С использованием программного обеспечения хроматографа были построены градуировочные графики для каждого из исследуемых веществ (рис. 3.4, 3.5), что позволило получить уравнения зависимости площади пика

от концентрации АСК и СК и производить автоматическую обработку хроматограмм при дальнейших исследованиях.

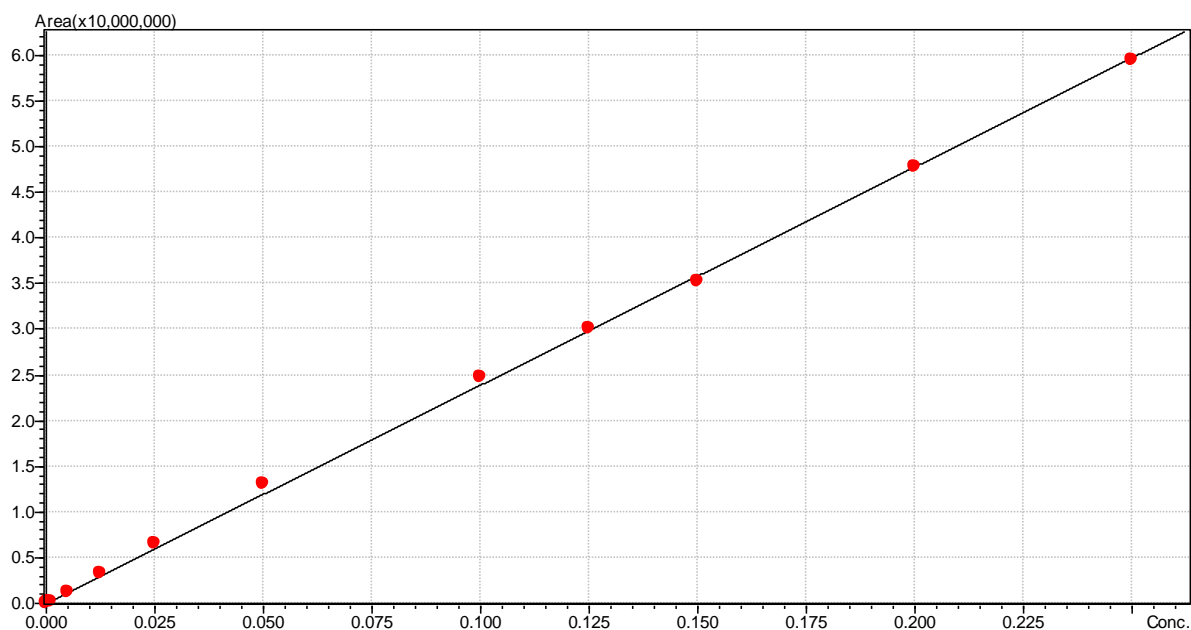


Рис. 3.3. Градуировочный график зависимости площади пика от концентрации АСК в среде RS

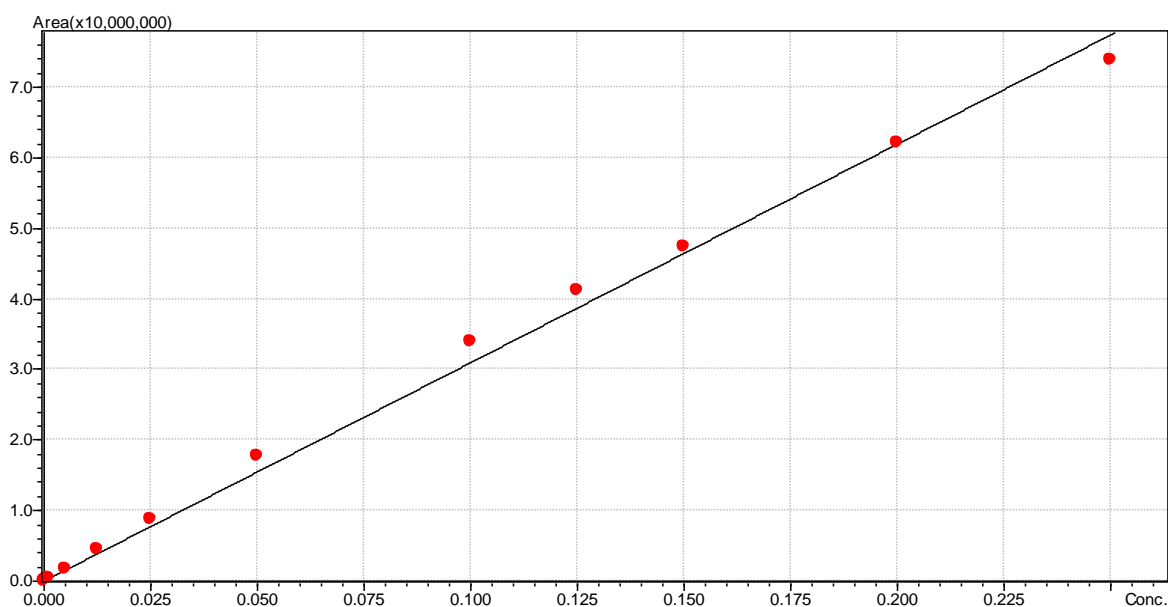


Рис. 3.4. Градуировочный график зависимости площади пика от концентрации СК в среде RS

Линейность методики исследовали с использованием растворов АСК и СК в среде RS в диапазоне концентраций 0,0001 – 0,25 %. Уравнения градуировочных графиков имели вид: $S = 2,39 \times 10^8 \times C$ (для АСК) и $S = 3,098 \times 10^8 \times C$ (для СК), где S – площадь хроматографического пика вещества,

C – концентрация вещества, %. Полученные коэффициенты корреляции (R^2), равные 0,9995 и 0,9964 для АСК и СК соответственно, свидетельствуют о линейности методики.

3.3.6. Определение параметров правильности и прецизионности

Для оценки правильности и прецизионности методики использовали смеси растворов АСК и СК в среде RS на 4 уровнях концентраций аналитов: 0,0001 % (НПКО); 0,0003 % (низкий уровень); 0,1 % (средний уровень) и 0,2% (высокий уровень). Прецизионность и правильность методики оценивали по величинам относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %) результатов измерения (табл. 3.10, 3.11).

Таблица 3.10

Оценка правильности и прецизионности методики определения АСК в среде RS методом ВЭЖХ

Концентрация АСК в модельной смеси, %	Определено АСК, %	\bar{x} (n = 6)	SD	RSD,%	ϵ ,%
1	2	3	4	5	6
0,0001	0,00012	0,000105	0,000015	14,28	20,00
	0,00011				10,00
	0,00009				-10,00
	0,00011				10,00
	0,00012				20,00
	0,00008				-20,00
0,0003	0,00031	0,00031	0,0000208	6,71	3,33
	0,00033				10,00
	0,00028				-6,67
	0,00034				13,33
	0,00029				-3,33
	0,00031				3,33
0,1	0,0891	0,10005	0,0000567	7,52	-10,90
	0,0936				-6,40
	0,1030				3,00
	0,0968				-3,20
	0,1077				7,70
	0,1101				10,10
0,2	0,2230	0,207	0,0107	5,17	11,50
	0,2078				3,90
	0,1895				-8,45
	0,2114				5,70
	0,2132				6,60
	0,1988				-0,60

**Оценка правильности и прецизионности методики определения СК
в среде RS методом ВЭЖХ**

Концентрация СК в модельной смеси, %	Определено СК, %	\bar{x} (n = 6)	SD	RSD, %	ε , %
1	2	3	4	5	6
0,0001	0,00009	0,000095	0,000015	14,78	-10,00
	0,00009				-10,00
	0,00011				10,00
	0,00011				10,00
	0,00008				-20,00
	0,00008				-20,00
0,0003	0,00028	0,000293	0,0000251	8,56	-6,67
	0,00030				0,00
	0,00032				6,67
	0,00026				-13,33
	0,00027				-10,00
	0,00033				10,00
0,1	0,1027	0,0985	0,0089883	9,12	2,70
	0,1093				9,30
	0,0869				-13,10
	0,0931				-6,90
	0,1092				9,20
	0,0900				-10,00
0,2	0,2033	0,201	0,0142	7,06	1,65
	0,2167				8,35
	0,2034				1,70
	0,1917				-4,15
	0,2087				4,35
	0,1842				-7,90

Полученные значения RSD не превышают 15%, допустимых для биоаналитических методик, что свидетельствует об отсутствии значимых систематических ошибок в результатах анализа АСК и СК в среде RS [132, 133].

Таким образом, разработанная методика является специфичной для определения содержания АСК в постферментационных средах родококков, характеризуется выраженной правильностью и прецизионностью, что позволяет использовать ее для достоверной оценки остаточного содержания АСК в процессе биодеструкции [42, 58].

3.4. Определение остаточного содержания ацетилсалициловой кислоты в процессе биодеструкции

Разработанную методику использовали для определения остаточного содержания АСК в процессе биодеструкции. Поскольку МПК АСК в отношении клеток *R. jostii* ИЭГМ 60 равна 500 мг/л, то максимальная начальная концентрация АСК в культуральных средах родококков может составлять не более 0,05%. Поэтому для процесса биодеструкции в ряде предварительных экспериментов использовали нативную АСК в концентрации 0,01 – 0,05% (100 – 500 мг/л). Как видно из табл. 3.12, продолжительность процесса биодеструкции АСК при начальной концентрации исходного субстрата 0,01–0,04 % соответствует 4 сут.

Таблица 3.12.

Динамика изменения содержания АСК (0,01 – 0,04 %) в виде фармацевтической субстанции в процессе биодеструкции клетками *R. jostii* ИЭГМ 60

Начальная концентрация АСК, мг/л	Экспозиция, сут				
	0	1	2	3	4
	Определено АСК*, %				
400	100,00	47,02	5,58	0,17	0
300	100,00	45,98	4,38	0,09	0
100	100,00	35,48	3,18	0,03	0

*Начальная концентрация АСК принята за 100%.

При концентрации АСК 0,05 % процесс биодеструкции не происходит вследствие подавления жизнедеятельности клеток, что объясняется низким значением рН (менее 5,0) постферментационной среды родококков. В связи с этим для увеличения концентрации исходного субстрата до 0,25 %, что соответствует средней терапевтической дозе АСК в лекарственных формах (250 мг), в дальнейших опытах АСК переводили в салицилат натрия добавлением эквивалентного количества гидрокарбоната натрия (0,24 г). При этом значение рН постферментационной среды увеличилось с 5,0 до 6,9. Последнее, по нашим данным, является оптимальным для жизнедеятельности используемых бактериальных клеток. Продолжительность процесса

биодеструкции АСК в виде фармацевтической субстанции в связи с увеличением концентрации исходного субстрата с 0,05 % до 0,25 % увеличилась с 4 до 11 сут (табл. 3.13). Следует отметить, что продолжительность процесса биодеструкции АСК (0,25 %) в виде таблеток оказалась почти в 2 раза меньше (6 сут), чем фармацевтической субстанции (табл. 3.13).

Таблица 3.13.

**Динамика изменения содержания АСК (0,25 %) в виде
фармацевтической субстанции и таблеток в процессе биодеструкции
клетками *R. jostii* ИЭГМ 60**

Объект анализа	Экспозиция, сутки								
	0	3	4	5	6	7	9	10	11
	Определено АСК*, %								
АСК	100	**	**	**	**	38,59	2,01	0,72	0
АСК+ПВП	100	**	**	22,43	4,01	2,18	0	***	***
АСК таблетки	100	37,46	12,03	2,12	0	***	***	***	***

*Начальная концентрация АСК принята за 100%; **– остаточная концентрация АСК на данном этапе процесса биодеструкции не исследовалась;***– процесс завершен.

Ранее проведенные исследования показали, что вспомогательные вещества таблеток могут выступать в качестве косубстратов и интенсифицировать процесс биодеструкции лекарственных средств, парацетамола, в частности [10, 33]. При исследовании влияния вспомогательных веществ на процесс биодеструкции АСК (0,25 %) установлено, что внесение в среду культивирования родококков крахмала, стеариновой кислоты, лактозы и талька не приводит к изменению продолжительности процесса. Однако, дополнительное внесение в ростовую среду ПВП приводит на 9-е сут к полной деградации АСК клетками *R. jostii* ИЭГМ 60. Следовательно, ПВП в данном случае выступает в качестве дополнительного источника питания для бактериальных клеток. Именно

присутствие ПВП в модельной смеси вспомогательных веществ таблеток сокращает процесс биодеструкции АСК в виде фармацевтической субстанции с 11 до 9 сут, а в таблетированной лекарственной форме – до 6 сут (табл. 3.13). Следует отметить, что значение рН культуральной среды родококков остается в пределах от 6,5 до 7,2 (среднее из трех определений) на протяжении всего процесса биодеструкции АСК в присутствии вспомогательных веществ таблеток.

3.5. Математическое моделирование процесса биодеструкции ацетилсалициловой кислоты

Для сравнительного анализа скорости биодеструкции АСК использовали кинетическое уравнение первого порядка $dx/dt = -kx$ с начальным условием $x_0 = 100\%$ при $t = 0$, которое адекватно описывает динамику изменения концентрации x лекарственных средств (дротаверина гидрохлорида, парацетамола, кодеина фосфата и др.) [22, 29, 96]. Значения параметра скорости биодеструкции k определяли с применением метода наименьших квадратов по данным табл. 3.12, 3.13. Помимо этого, согласно выражению $t_{1/2} = \ln(2)/k$ определяли период полураспада АСК в процессе биодеструкции. Результаты кинетического моделирования представлены в табл. 3.14.

Таблица 3.14.

Параметр скорости биодеструкции и период полураспада АСК (0,01 – 0,25%)

Варианты опыта	Фармацевтическая субстанция АСК				АСК +ПВП	Таблетка АСК
Начальная концентрация АСК, %	0,01	0,03	0,04	0,25	0,25	0,25
Параметр скорости k , сутки ⁻¹	1,8214	1,5596	1,4411	0,6917	0,7713	0,8346
Период полураспада $t_{1/2}$, сутки	0,38	0,44	0,48	1,00	0,90	0,83
Номер кривой на рис. 3.5	1	2	3	6	5	4

Как следует из данных табл. 3.14, при увеличении начальных концентраций АСК с 0,01 до 0,04 % значения параметра k скорости процесса биодеструкции уменьшились с 1,8214 до 1,4411 сут⁻¹. Соответственно период полураспада $t_{1/2}$ увеличился с 0,38 до 0,48 сут. Увеличение начальной концентрации АСК в виде фармацевтической субстанции до 0,25 % привело к уменьшению параметра скорости в 2 раза с соответствующим увеличением периода полураспада. Добавка ПВП в среду культивирования родококков привела к увеличению параметра скорости с 0,6917 до 0,7713 сут⁻¹ при уменьшении периода полураспада АСК на 10 %. Использование АСК (0,25%) в таблетированной лекарственной форме увеличило параметр скорости до 0,8346 сут⁻¹ и уменьшило период полураспада на 17 % по сравнению с фармацевтической субстанцией [62].

Кинетические кривые, характеризующие изменение остаточной концентрации АСК в постферментационных средах родококков, образуют две отдельные группы, характерные для малых (0,01 – 0,04 %) и больших (0,25 %) начальных концентраций АСК (рис. 3.5).

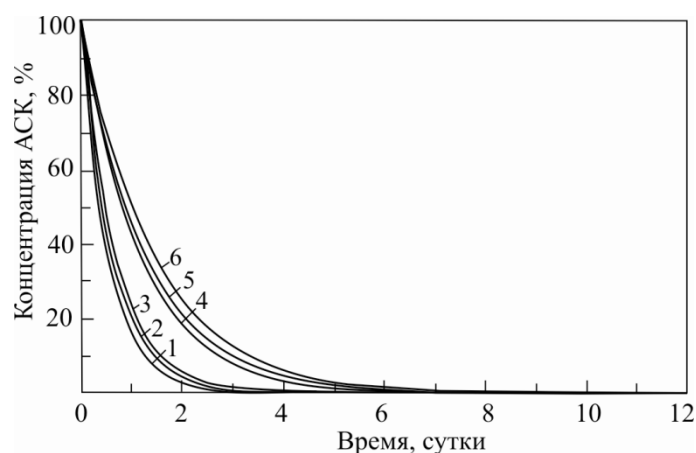


Рис. 3.5. Кинетические кривые изменения концентрации АСК в процессе биодеструкции (нумерация кривых соответствует вариантам опыта в табл. 3.13).

Каждая группа кривых хорошо соответствует полученным экспериментальным данным (табл. 3.13, 3.14).

Следует отметить, что идея кинетического моделирования экспериментальных реализаций процессов биологической деструкции ЛС, которые относятся к нестационарным случайным процессам, получила развитие в работе [65]. В данной работе кинетически моделируемый процесс биодеструкции ЛС представлен обыкновенной функцией системы случайных величин, являющихся параметрами кинетических уравнений в экспериментальных реализациях. Дело в том, что при одинаковых, казалось бы, условиях эксперимента реализации процесса биодеструкции одного и того же вещества отличаются друг от друга, то есть процесс биологической деструкции ЛС носит случайный характер. При гипотезе о нормальном законе распределения системы случайных величин приведена и доказана лемма, следствия из которой позволяют определить аналитические выражения для числовых характеристик случайного процесса и его скорости. Разработанная методика вероятностного анализа применима для процессов биодеструкции ЛС в экспериментах на повторяемость, что особенно важно с учетом их продолжительности и трудоемкости.

Выводы по главе 3

1. Установлено, что активным штаммом-биодеструктором АСК является *R. jostii* ИЭГМ 60, способный к биодеструкции АСК в качестве единственного источника углерода и энергии.
2. Разработана методика количественного определения АСК в постферментационных средах родококков методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.
3. Процедурой валидации подтверждена селективность, линейность, прецизионность и правильность разработанной методики и ее пригодность для определения остаточного содержания АСК в процессе биодеструкции.
4. С использованием математического моделирования установлено влияние начальной концентрации АСК и вспомогательных веществ таблеток на продолжительность, скорость процесса биодеструкции и период полураспада АСК.

Глава 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ПРОДУКТОВ БИОДЕСТРУКЦИИ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДАМИ ТСХ И ВЭЖХ/МС

В данной главе представлены результаты исследования химического состава и количественного содержания продуктов бактериальной деструкции ацетилсалициловой кислоты, а также пути биодеструкции данного вещества клетками *R. jostii* ИЭГМ 60. Разработан лабораторный регламент получения продуктов бактериальной деструкции ацетилсалициловой кислоты, содержащих фумаровую кислоту, с использованием автоматизированной ферментационной установки.

4.1. Исследование химического состава продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты методом ТСХ

Исследование химического состава продуктов биодеструкции АСК методом ТСХ подразумевало выбор условий хроматографирования, при которых происходит наиболее эффективное разделение АСК и ее метаболитов, связанное с оптимизацией значений R_f и селективности. Известно, что при рассмотрении селективности хроматографической системы по отношению к анализируемой смеси учитываются как свойства сорбента (неподвижной фазы), так и растворителя (подвижной фазы) [66, 69, 70, 95]. При условии постоянства состава сорбата и сорбента удерживание веществ будет зависеть только от параметров подвижной фазы, поэтому в данном случае поиск оптимальной хроматографической системы заключался в определении оптимального элюента.

4.1.1. Выбор оптимального состава подвижной фазы

В качестве компонентов подвижной фазы использовали этанол, метанол, этилацетат, ацетон, хлороформ, ледяную уксусную кислоту в различных соотношениях. Данные компоненты зачастую присутствуют в составе подвижных фаз, используемых для разделения органических кислот [6, 66, 70, 95]. Спирты большей молекулярной массы по сравнению с

метанолом и этанолом в хроматографии используются редко из-за их высокой вязкости, которая затрудняет подъем элюента по слою сорбента за счет капиллярных сил. Кроме того, при использовании спиртов, отличных от метанола и этанола, диффузия веществ в подвижной фазе может быть затруднена, что окажет дополнительное негативное влияние на эффективность разделения компонентов смеси [1, 66, 69, 70, 95]. Ледяная уксусная кислота была рассмотрена нами с целью увеличения селективности и эффективности хроматографической системы. Выбор ледяной уксусной кислоты был сделан в связи с ее способностью придавать элюирующей системе кислотные свойства. При этом уменьшается полярность системы, вследствие чего уменьшается ионизация изучаемых соединений, что способствует образованию более компактных пятен на хроматограмме.

Однокомпонентные подвижные фазы на примере этилацетата и этанола показали незначительную разделяющую способность и неудовлетворительную сходимость параметров удерживания аналитов, поэтому все дальнейшие исследования проводились в двух- и трехкомпонентных системах.

В работе использовали 0,25 % раствор АСК в виде салицилата натрия, полученный при взаимодействии АСК с эквивалентным количеством гидрокарбоната натрия. Значение рН полученного раствора составляло 6,7. В качестве возможных продуктов биодеструкции АСК были исследованы пирокатехин, гидрохинон, *цис*, *цис*-муконовая, гентизиновая и фумаровая кислоты в виде 0,01 % этанольных растворов.

Для разделения АСК и возможных продуктов ее биодеструкции апробировали 5 составов подвижных фаз:

- 1) хлороформ – этанол 96% (80:20);
- 2) этилацетат – этанол 96% – ледяная уксусная кислота (80:80:5);
- 3) хлороформ – ацетон – этанол 96% (15:15:10);
- 4) этанол 96% – хлороформ – ледяная уксусная кислота (15:10:0,5);
- 5) хлороформ – ацетон (50:50).

Детектирование осуществляли в УФ свете при длине волны 254 нм. Значения Rf исследуемых веществ представлены в табл. 4.1.

Таблица 4.1.

Значения Rf АСК и ее возможных метаболитов в системах 1-5

Исследуемые вещества	Системы растворителей				
	1	2	3	4	5
АСК	0,25	0,68	0,58	0,76	0,50
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
Гентизиновая кислота	0,26	0,63	0,60	0,77	0,50
Фумаровая кислота	0,46	0,56	–	0,81	–

Примечание: каждое значение Rf – среднее из 3 определений; «–» зона вещества не обнаружена.

В результате изучения параметров удерживания АСК и возможных продуктов ее биодеструкции (табл. 4.1) в качестве оптимальной была выбрана система (2) этилацетат – этанол 96% – ледяная уксусная кислота (80:80:5), эффективно разделяющая исследуемые вещества и позволяющая получать коэффициенты удерживания в оптимальном диапазоне.

4.1.2. Определение оптимального способа детектирования и пределов обнаружения исследуемых веществ

При определении оптимального способа детектирования АСК и возможных продуктов ее биодеструкции использовали физический метод – облучение пластин УФ светом при длине волны 254 нм, а также химический метод обнаружения аналитов раствором хлорида железа (III) и параами йода.

Для оценки чувствительности способа обнаружения веществ устанавливали минимальное количество АСК и возможных продуктов ее биодеструкции (пирокатехина, гидрохинона, *цис, цис* - муконовой, гентизиновой и фумаровой кислот) в пятне, которое визуально обнаруживалось на пластине. Предел обнаружения исследуемых веществ определяли, используя их этанольные растворы (0,0025 – 0,325 %) в

количестве 10 мкл. При этом готовили серии разведений веществ в концентрациях 0,325 %, 0,162 %, 0,081 %, 0,040 %, 0,020 %, 0,010 %, 0,005 % и 0,0025 %. На линию старта наносили постепенно убывающее количество каждого из веществ и хроматографировали в системе растворителей этилацетат – этанол 96% – ледяная уксусная кислота (80:80:5). Далее пластины просматривали в УФ свете либо обрабатывали цветореагентом.

Результаты исследования способов детектирования и пределов обнаружения веществ представлены в табл. 4.2.

Таблица 4.2.

Пределы обнаружения АСК и возможных продуктов ее биодеструкции при различных способах детектирования

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

Примечание: «–» зона вещества не обнаружена.

Как видно из табл. 4.2, наиболее чувствительным детектором АСК и продуктов ее биодеструкции является УФ свет при длине волны 254 нм. Цветореагенты менее чувствительны в отношении исследуемых веществ по сравнению с УФ светом.

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

$$|X_1 - X_n| < L(P, m) \times S [132].$$

Оценка повторяемости результатов параллельных определений коэффициентов подвижности АСК и продуктов ее биодеструкции

Исследуемые вещества	Метрологические характеристики (n=3, P =95%, L=3,31)					
	X ₁	X ₂	X ₃	X _{ср}	S	L*S
АСК	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
Гентизиновая кислота	0,62	0,64	0,63	0,63	0,0100	0,03310
Фумаровая кислота	0,56	0,57	0,55	0,56	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 % [124].

Данные табл. 4.3 свидетельствуют о повторяемости (сходимости) измерений коэффициентов подвижности АСК и возможных продуктов ее биодеструкции.

Разработанная методика была использована для динамического детектирования АСК и ее метаболитов в постферментационных средах родококков в процессе биодеструкции АСК.

4.1.3. Динамическое детектирование ацетилсалициловой кислоты и ее метаболитов в процессе биодеструкции методом ТСХ

Для динамического детектирования АСК и ее метаболитов использовали постферментационные среды родококков, отобранные на разных этапах процесса биодеструкции АСК. Начальная концентрация АСК составляла 0,25 %. Процесс биодеструкции проводили в разных условиях, отличающихся значениями рН (6,0 и 6,9) и продолжительностью, соответственно 22 сут и 11 сут. Данные условия соответствует полученным ранее экспериментальным данным (глава 3, раздел 3.4), свидетельствующим

о том, что значение рН постферментационной среды, равное 6,7 – 6,9, является оптимальным для жизнедеятельности бактериальных клеток, в отличие от рН 6,0, которое близко к губительной для клеток кислой среде.

Методика хроматографирования. На поле хроматограммы, разделённое на семь равных секторов, на линию старта с помощью микрошприца наносили 10 мкл постферментационной среды родококков, содержащей АСК и ее метаболиты, а также 0,01 % стандартные растворы АСК, пирокатехина, гидрохинона, *цис*, *цис* - муконовой, гентизиновой и фумаровой кислот в среде RS. Пластины помещали в хроматографические камеры и проводили хроматографирование восходящим способом в системе растворителей этилацетат – этанол 96% – ледяная уксусная кислота (80:80:5). Детектирование веществ проводили в УФ свете при длине волны 254 нм. Хроматографические характеристики АСК и ее метаболитов в постферментационных средах родококков в процессе биодеструкции АСК представлены в табл. 4.4. и 4.5.

Таблица 4.4.

Хроматографические характеристики АСК и ее метаболитов в постферментационной среде в процессе биодеструкции при рН 6,0

Время, сутки	Значение Rf обнаруженного вещества		
	АСК	Пирокатехин	<i>Цис,цис</i> -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: каждое значение Rf – среднее из 3 определений; «–» зона вещества не обнаружена.

Как видно из табл. 4.4, промежуточный продукт разложения АСК – пирокатехин обнаруживается в постферментационной среде на 8-е сут. *Цис,цис*-муконовая кислота начинает детектироваться на 13-е сут, что свидетельствует о раскрытии ароматического кольца АСК. На 20-е сут в культуральной жидкости не обнаруживаются исходный субстрат АСК и *цис,цис*-муконовая кислота, но детектируется пирокатехин. На 21-е сут не обнаруживаются оба продукта разложения АСК – 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 АСК, его метаболиты отсутствуют [20, 57, 59].

Хроматографические характеристики АСК и ее метаболитов в процессе биодеструкции АСК при рН 6,9 показывают, что в постферментационной среде в качестве промежуточного продукта присутствует гентизиновая кислота, на конечном этапе – фумаровая кислота (табл. 4.5).

Таблица 4.5.

Хроматографические характеристики АСК и ее метаболитов в постферментационной среде в процессе биодеструкции при рН 6,9

Время, сутки	Значение Rf обнаруженного вещества		
	АСК	Гентизиновая кислота	Фумаровая кислота
1	0,68±0,01	–	–
2	0,68±0,01	0,63±0,01	–
3	0,69±0,01	0,64±0,01	–
8	0,68±0,01	0,64±0,01	0,55±0,01
9	0,68±0,01	0,63±0,01	0,57±0,01
11	–	–	0,56±0,01

Примечание: каждое значение Rf – среднее из 3 определений; «–» зона вещества не обнаружена.

Присутствие в постферментационной среде различных метаболитов при разных условиях проведения процесса биодеструкции АСК свидетельствует о возможности двух метаболических путей разложения

АСК, что согласуется с данными других авторов о путях метаболизма АСК бактериями *Pseudomonas aeruginosa* и грибами *Fusarium graminearum* [97, 114].

4.2. Определение содержания фумаровой кислоты в составе продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты методом ВЭЖХ/МС

Наряду с плоскостной хроматографией для исследования химического состава продуктов биодеструкции АСК использовали метод tandemной жидкостной хроматомасс-спектрометрии, позволяющий проводить количественное определение образующихся метаболитов. В качестве объектов исследования использовали постферментационные среды родококков, полученные в процессе биодеструкции АСК при рН 6,9, то есть в оптимальных условиях, способствующих сокращению продолжительности процесса. Как показано нами выше (4.1.3.), в данных условиях процесс биодеструкции АСК протекает по пути образования гентизиновой и фумаровой кислот.

Количественный анализ фумаровой кислоты, образующейся в конце процесса биодеструкции АСК, методом ВЭЖХ/МС в постферментационных средах родококков проводили в следующих подобранных нами условиях:

- хроматографическая колонка: Luna 5u 100C18 150×2 mm;
- подвижная фаза: 0,1 % раствор муравьиной кислоты: ацетонитрил (80:20);
- скорость потока элюента 0,4 мл;
- температура термостата 40°C.

Детектирование фумаровой кислоты проводили в режиме SIM (селективного ионного мониторинга) по депротонированному молекулярному иону 115.

В данных условиях время удерживания fumarовой кислоты при анализе стандартного водного раствора fumarовой кислоты (400 нг/мл) составило 1,25 мин (рис. 4.1).

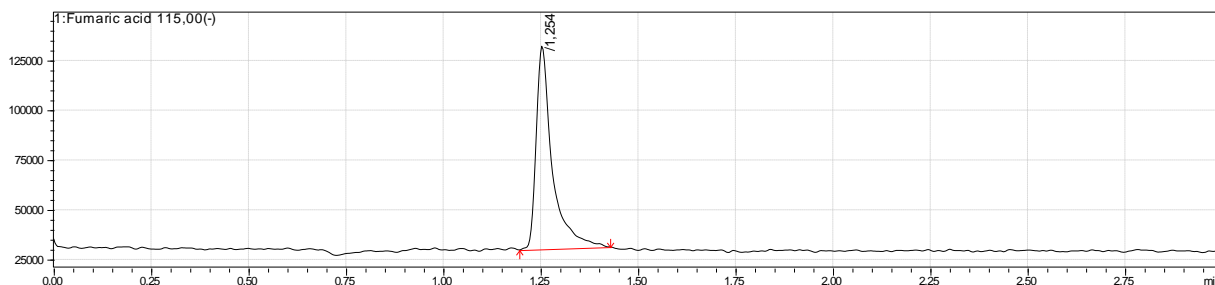


Рис. 4.1. Хроматограмма стандартного водного раствора fumarовой кислоты (400 нг/мл).

На хроматограмме образца постферментационной среды родококков в данных условиях обнаруживался пик со временем удерживания, соответствующим времени удерживания fumarовой кислоты (рис. 4.2).

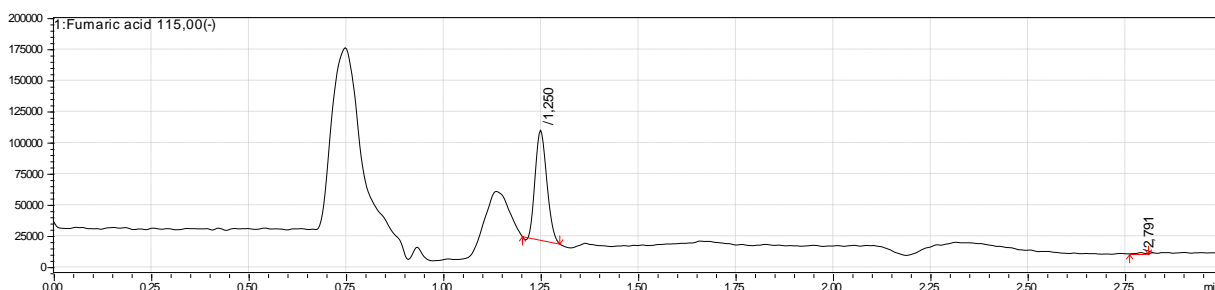


Рис. 4.2. Хроматограмма образца постферментационной среды родококков на 8-е сут процесса биодеструкции АСК (0,25 %).

Для подтверждения идентичности данных пиков были сняты масс-спектры второго порядка. В обоих случаях в масс-спектре присутствовали ионы 115 (молекулярный депротонированный) и фрагментные ионы с массами 71 и 69 (рис. 4.3, 4.4). Концентрация fumarовой кислоты в постферментационной среде родококков на 8-е сут процесса биодеструкции АСК (0,25 %) составила 6,6 мкг/мл.

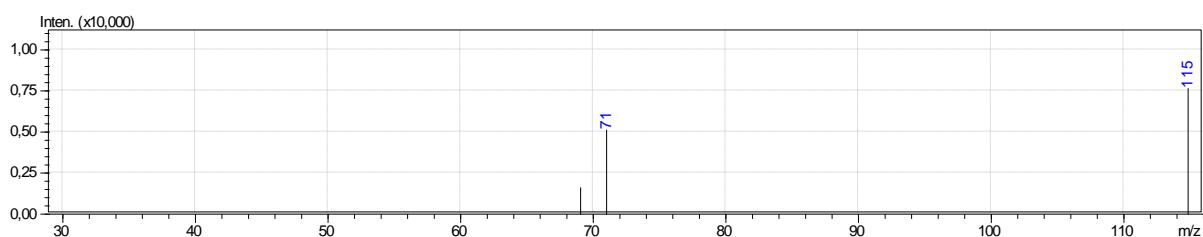


Рис. 4.3. Вторичный масс-спектр фумаровой кислоты (стандартный раствор).

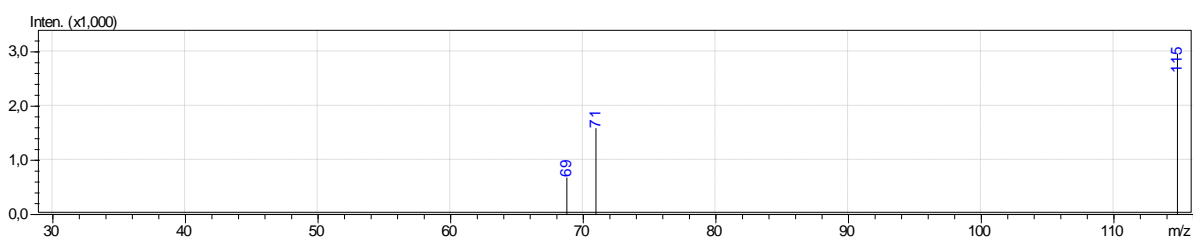


Рис. 4.4. Вторичный масс-спектр пика со временем удерживания 1,25 мин в образце культуральной жидкости родококков на 8-е сут процесса биодеструкции АСК (0,25 %).

Таким образом, методом тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии установлено, что в процессе биодеструкции АСК клетками *R. jostii* ИЭГМ 60 образуется фумаровая кислота.

4.3. Пути метаболизма ацетилсалициловой кислоты клетками *R. jostii* ИЭГМ 60

На основании полученных экспериментальных данных схему процесса биодеструкции АСК клетками *R. jostii* ИЭГМ 60 можно представить в следующем виде (рис. 4.5):

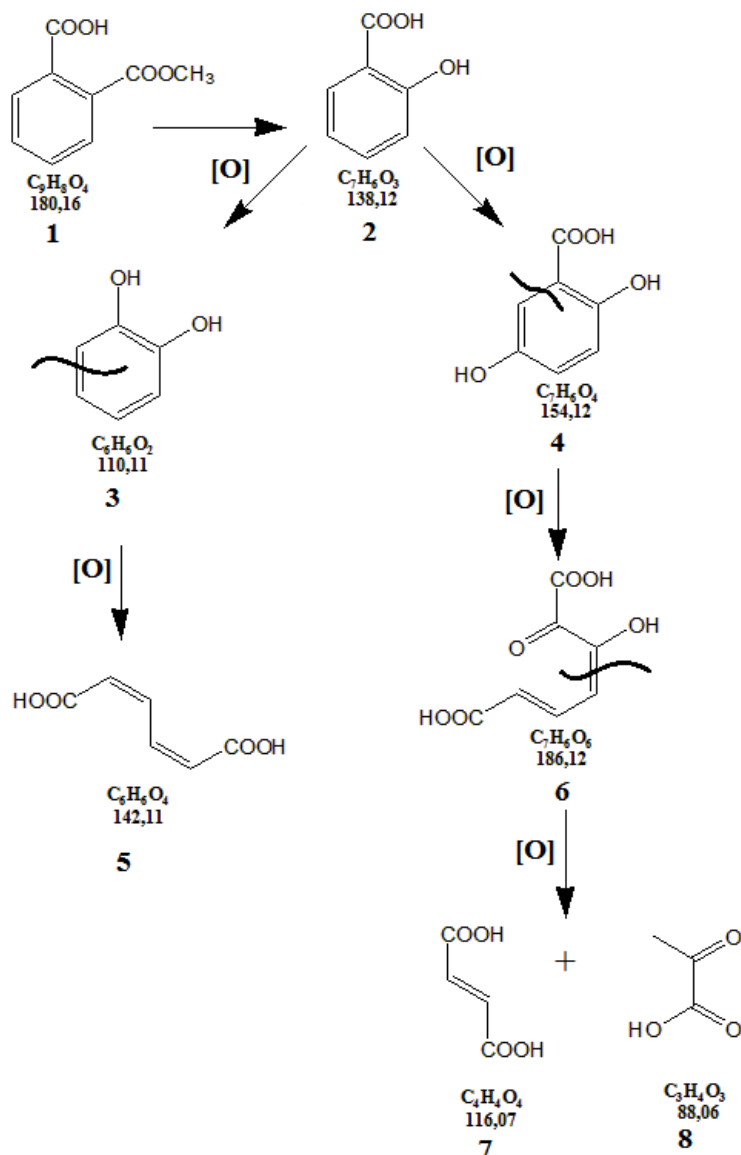


Рис. 4.5. Схема процесса биодеструкции АСК клетками *R. jostii* ИЭГМ 60.

1–ацетилсалициловая кислота, 2–салициловая кислота, 3–пирокатехин, 4–гентизиновая кислота, 5–*цис*, *цис*-муконовая кислота, 6–фумарилпируват, 7–фумаровая кислота, 8–пировиноградная кислота.

Как видно из рис. 4.5, биодеструкция АСК клетками *R. jostii* ИЭГМ 60 происходит по двум метаболическим путям. Первый путь протекает через декарбоксилирование салициловой кислоты (2) с образованием пирокатехина (3) и дальнейшей трансформацией его в *цис*, *цис*-муконовую кислоту (5).

Второй путь протекает через гидроксирование салициловой кислоты (2) в 5-е положение ароматического цикла с образованием гентизиновой кислоты (4), ароматическое кольцо которой расщепляется на следующем этапе до фумарилпировиноградной кислоты (6), превращающейся далее в фумаровую (7) и пировиноградную кислоты (8).

Известно, что обозначенные выше конечные продукты обоих путей биотрансформации АСК утилизируются в цикле Кребса с выделением углекислого газа и воды [88].

Возможность биодеструкции салицилатов по пути гентизиновой кислоты показал М. Civilini *et al.* [97]. Так, при разложении салицилатов *Pseudomonas aeruginosa* 2NR продуцирует интермедиаты орто-катехинового пути и гентизиновую кислоту (рис. 1.6). Способность накапливать и разлагать гентизиновую кислоту показывает, что *Pseudomonas aeruginosa* 2NR разлагает салицилаты по нескольким метаболическим путям. Очевидно, и родококки метаболизируют салицилаты в зависимости от условий либо по пути образования пирокатехина, либо по пути образования гентизиновой кислоты, которая далее превращается в пировиноградную и фумаровую кислоты.

4.4. Разработка технологической документации для получения фумаровой кислоты из ацетилсалициловой кислоты микробиологическим способом

Для масштабирования процесса получения фумаровой кислоты из ацетилсалициловой кислоты микробиологическим способом необходима разработка технологической документации. В связи с этим разработана технологическая схема получения фумаровой кислоты, а также лабораторный регламент с использованием ферментационной установки «BioFlo/CelliGen 115, Eppendorf» (рис. 4.6) с загрузкой, в 20 раз превышающей таковую при выполнении эксперимента (приложение 1).

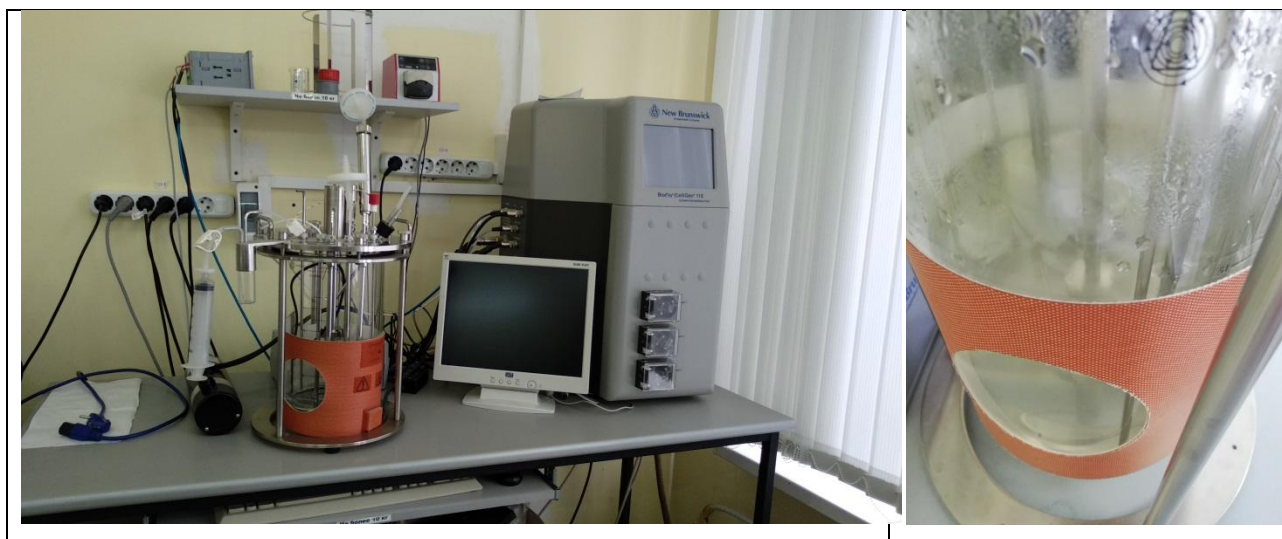


Рис. 4.6. Лабораторная ферментационная установка «BioFlo/CelliGen 115, Eppendorf»

Результаты определения остаточного содержания АСК в процессе биодеструкции на автоматизированной ферментационной установке представлены в табл. 4.6.

Таблица 4.6.

**Динамика изменения содержания АСК
в процессе биодеструкции клетками *R. jostii* ИЭГМ 60
на установке «BioFlo/CelliGen 115, Eppendorf»**

Объект анализа	Экспозиция, сутки								
	0	1	3	5	7	9	10	12	15
	Определено АСК*, %								
АСК	100	**	**	90,32	**	**	40,72	4,98	0

*Начальная концентрация АСК принята за 100%; **– остаточная концентрация АСК на данном этапе процесса биодеструкции не исследовалась.

Время полной биодеструкции АСК на установке «BioFlo/CelliGen 115, Eppendorf» составляет 15 сут (табл. 4.6). Фумаровая кислота детектируется в постферментационной среде родококков на 10-е, 12-е и 15-е сутки.

Выводы по главе 4

1. Показано, что процесс биодеструкции ацетилсалициловой кислоты клетками *R. jostii* ИЭГМ 60 может происходить по двум метаболическим путям, один из которых приводит к образованию гентизиновой кислоты, превращающейся на конечных этапах в фумаровую кислоту. Концентрация фумаровой кислоты на 8-е сут процесса биодеструкции составляет 6,6 мкг/мл.

2. Предложена схема процесса биодеструкции ацетилсалициловой кислоты клетками *R. jostii* ИЭГМ 60.

3. Разработан лабораторный регламент получения продуктов бактериальной деструкции ацетилсалициловой кислоты, содержащих фумаровую кислоту. Технологическая документация реализована при проведении процесса биодеструкции ацетилсалициловой кислоты на автоматизированной ферментационной установке.

Глава 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОДУКТОВ БИОДЕСТРУКЦИИ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

В данной главе представлены результаты исследования острой токсичности, фитотоксичности, антиоксидантной активности и фитостимулирующего действия продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты в лабораторных условиях и в условиях полевого эксперимента.

5.1. Токсические свойства продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты

5.1.1. Острая токсичность

Исследование острой токсичности продуктов биодеструкции АСК показало, что средняя летальная доза LD_{50} продуктов биодеструкции АСК составила 2580,0 мг/кг, что соответствует 3 классу токсичности (умеренно токсичные вещества) [52]. Средняя летальная доза АСК (контроль) равна 1410,0 мг/кг [25]. Для получения доверительных границ умножали разность значений $1410 - 1200 = 210$ и $1700 - 1410 = 290$ на 2,36 (t-критерий Стьюдента при уровне значимости $\alpha = 0,05$ и числе степеней свободы $n-1 = 7$). Полученные результаты (495,6 и 684,4) относили к математическому ожиданию (2580) и получали доверительные границы с вероятностью 95 % (914,4÷2094,4).

Таким образом, острая токсичность продуктов биодеструкции АСК ($LD_{50}=2580,0$ мг/кг) почти в 2 раза меньше, чем АСК ($LD_{50}=1410,0$ мг/кг)[55].

5.1.2. Класс опасности для окружающей природной среды

Установленное значение LD_{50} продуктов биодеструкции АСК использовали для расчета их класса опасности для окружающей природной среды (ОПС) [38]. Расчет проводили следующим образом:

1. $LD_{50} = 2580$ мг/кг в диапазоне от 151 до 5000 мг/кг – 3 балла.
2. Показатель информационного обеспечения ($n/N = 1/12$) – 1 балл.

3. Относительный параметр опасности компонента отхода для ОПС:

$$X_i = (3+1) / 2 = 2.$$

4. Значение $Z_i = 4 \times X_i / 3 - 1/3 = 4 \times 2/3 - 1/3 \approx 2,33$.

5. Поскольку $2 < Z_i < 4$, то степень опасности отхода для ОПС:

$$W_i = 10^{Z_i} = 10^{2,33} \approx 215,44.$$

6. Показатель опасности отхода: $K_i = C_i / W_i = 2500 / 215,44 = 11,6$.

Следовательно, в концентрации 2500 мг/кг продукты бактериальной деструкции ацетилсалициловой кислоты относятся к IV классу опасности, то есть являются мало опасными для окружающей природной среды [60].

5.1.3. Фитотоксичность

Исследование фитотоксичности ПБ АСК, полученных на завершающем этапе процесса и содержащих фумаровую кислоту в концентрации 0,0006%, показало, что данные продукты не оказывают токсических эффектов на тест-культуру – семена овса посевного (табл. 5.1, рис. 5.1 б).

Таблица 5.1

Длина корней проростков семян овса посевного

Вносимый агент	Средняя длина корней, мм	Значения статистического критерия
Вода очищенная	33±2,0	–
Раствор АСК 0,25 % в среде RS	20±3,0	$t = 3,61$ $t_{кр} = 2,01$
ПБ АСК	38±2,9	$t = 0,40$ $t_{кр} = 2,01$

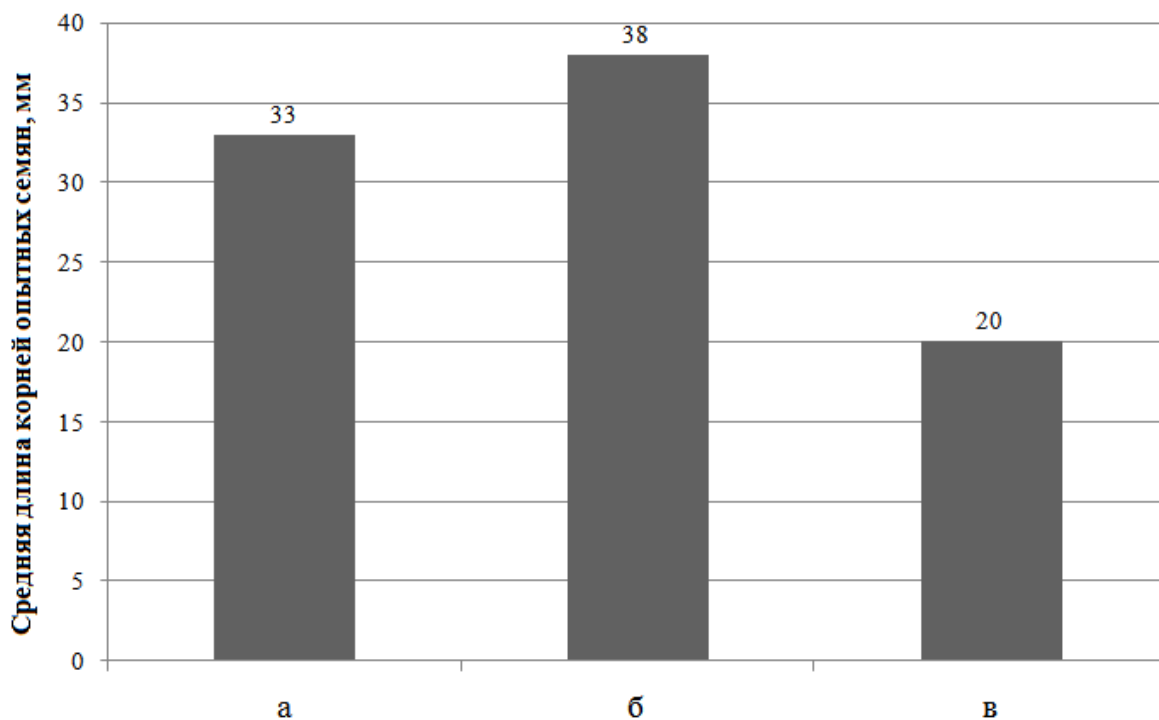


Рис. 5.1. Зависимость средней длины корней проростков семян овса посевного от вносимого агента: а – контроль вода, б – ПБ АСК, в – раствор АСК 0,25 %

Следует отметить, что исходный субстрат (АСК 0,25 %) оказывает угнетающее действие на тест-культуру (табл. 5.1 , рис. 5.1 в).

5.2. Антиоксидантная активность

Антиоксидантную активность ПБ АСК устанавливали фотометрическим методом с использованием раствора ДФПГ• радикала [100]. В качестве эталона сравнения применяли аскорбиновую кислоту.

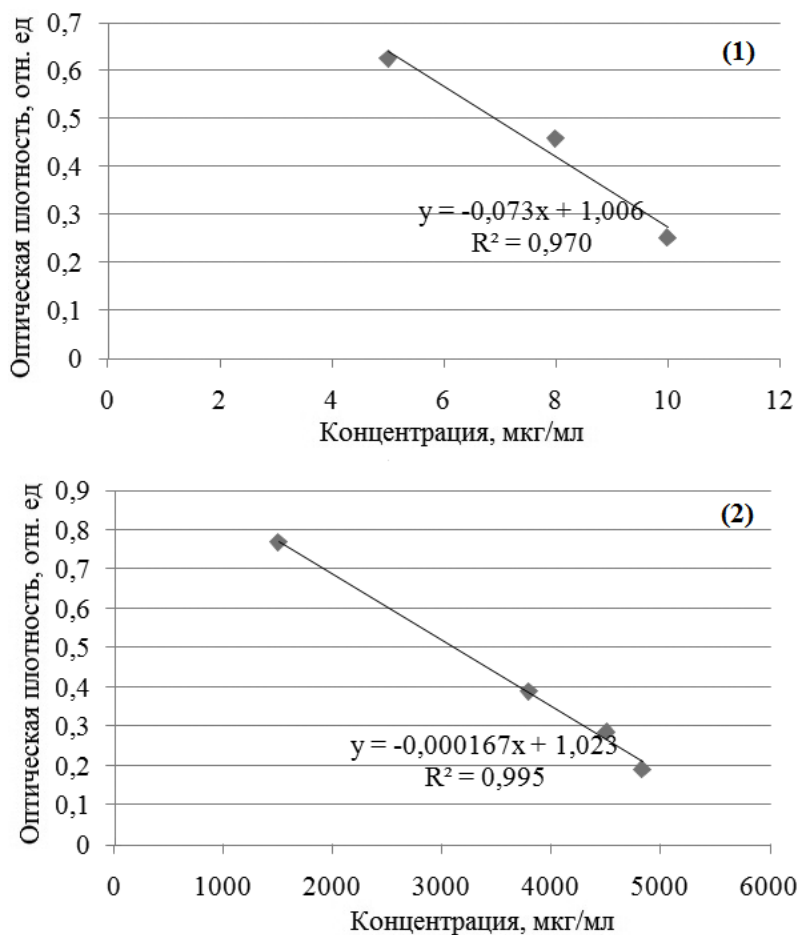


Рис. 5.2. Зависимость оптической плотности раствора ДФПГ[•] от концентрации аскорбиновой кислоты (1) и ПБ АСК (2).

Уравнения линейной регрессии, установленные по значениям оптической плотности для различных концентраций ПБ АСК и аскорбиновой кислоты, позволили определить антиоксидантную активность ПБ АСК (рис. 5.2). Так, отношение угловых коэффициентов прямых 1 и 2, представленных на рис. 5.2, равняется 0,0023. Следовательно, 1 г ПБ АСК эквивалентен 0,0023 г аскорбиновой кислоты.

Таким образом, ПБ АСК проявляют слабую антиоксидантную активность по сравнению с аскорбиновой кислотой.

5.3. Исследование фитостимулирующего действия продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты в лабораторных условиях

Как показано нами ранее при исследовании фитотоксичности ПБ АСК, данные продукты не только не оказывают токсических эффектов на тест-культуру, но и стимулируют рост корней проростков семян овса посевного (табл. 5.1, рис. 5.1 б). Поскольку в составе ПБ АСК присутствует фумаровая кислота, то представляло интерес исследовать влияние концентрации данного вещества на фитоэффект в условиях лабораторного эксперимента. Зависимость средней длины корней проростков семян овса посевного от концентрации фумаровой кислоты представлена на рис. 5.3.

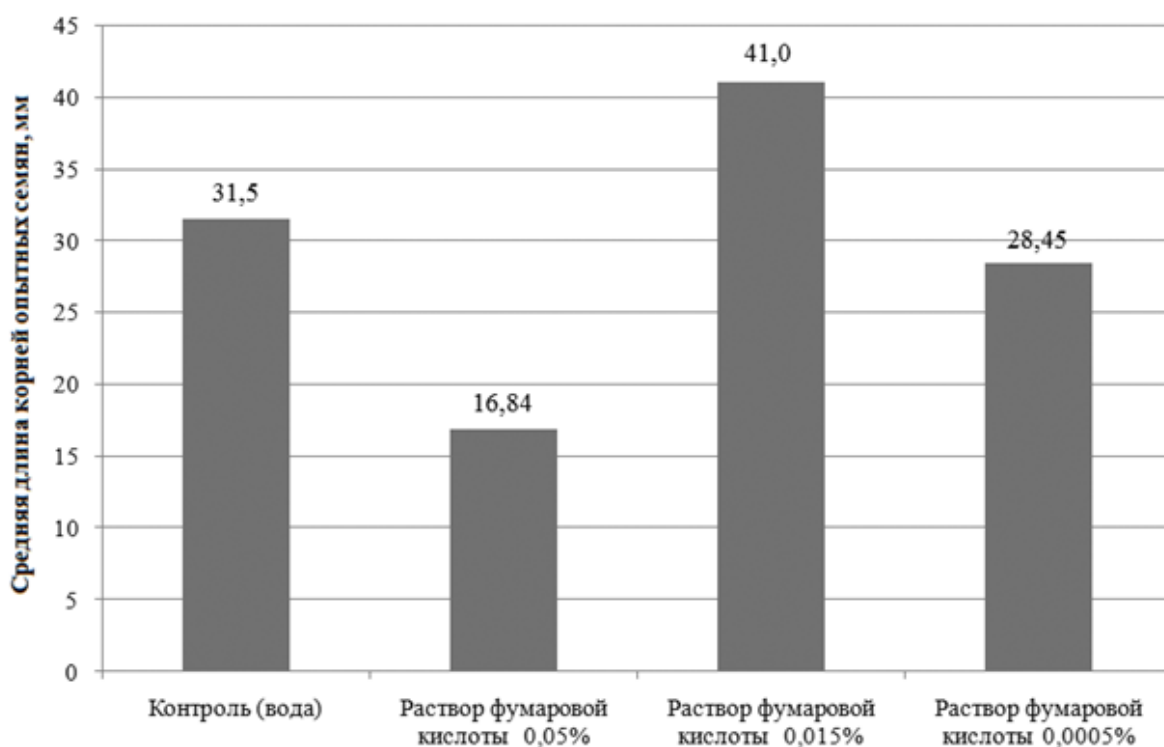


Рис. 5.3. Зависимость средней длины корней проростков семян овса посевного от концентрации фумаровой кислоты

Как видно из рис. 5.3, фумаровая кислота в концентрации 0,015% оказывает фитостимулирующий эффект, а в концентрации 0,05% – угнетающий эффект в отношении тест-культуры – семян овса посевного. При

концентрации фумаровой кислоты 0,0005% фитозффект наблюдается на уровне контроля с водой.

Таким образом, фумаровая кислота проявляет фиторегулирующие свойства в зависимости от концентрации. Фитостимулирующий эффект ПБ АСК зависит от концентрации фумаровой кислоты в их составе [61].

5.4. Исследование фитостимулирующего действия продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты на зверобой продырявленный в условиях полевого эксперимента

Следующий этап исследований был посвящен изучению фитостимулирующего действия продуктов биодеструкции АСК в отношении лекарственного растения – зверобоя продырявленного на базе Ботанического сада им. А.Г. Генгеля Пермского государственного национального исследовательского университета (Пермь). Для увеличения концентрации фумаровой кислоты в составе ПБ АСК с 0,0006% до 0,015% необходимо было сконцентрировать постферментационную среду родококков в 30 раз. Однако при этом следует ожидать 30-кратного увеличения концентрации минеральных солей, входящих в ее состав, что могло негативно отразиться на росте растений. В связи с этим семена и растущую траву зверобоя продырявленного обрабатывали ПБ АСК без предварительного концентрирования культуральных жидкостей родококков. В качестве контролей использовали воду и раствор фумаровой кислоты 0,015%. В качестве критерия оценки влияния ПБ АСК на зверобой продырявленной использовали количественный показатель – содержание флавоноидов в траве, собранной с обработанных и не обработанных ПБ АСК растений.

Как видно из рис. 5.4, ПБ АСК оказывают положительный эффект на динамику накопления флавоноидов в траве зверобоя продырявленного. Однако величина эффекта относительно невелика из-за низкого содержания в их составе фумаровой кислоты (0,0006%). Нативная фумаровая кислота в концентрации 0,015% оказывает существенный фитостимулирующий эффект

на зверобой продырявленный, увеличивая концентрацию флавоноидов в траве на 33% по сравнению с контролем – водой, что подтверждает результаты лабораторного эксперимента и согласуется с данными литературы [27, 43].

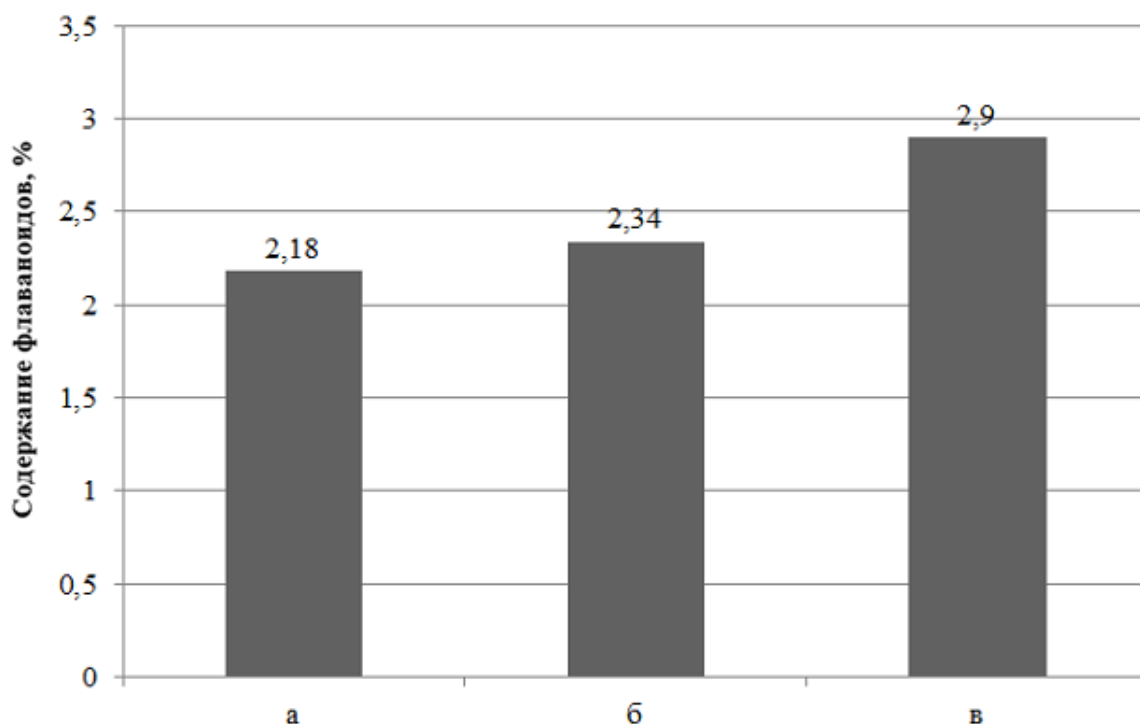


Рис. 5.4. **Содержание флавоноидов в траве зверобоя продырявленного:** а – растения контрольной площадки, б – растения обработаны ПБ АСК, в – растения обработаны раствором фумаровой кислоты 0,015 %.

Полученные результаты свидетельствуют, что для повышения величины фитостимулирующего эффекта ПБ АСК перспективны поиски условий оптимизации процесса биодеструкции АСК, обеспечивающие выход фумаровой кислоты в концентрации не менее 0,015%.

Выводы по главе 5

1. Установлено, что продукты биодеструкции ацетилсалициловой кислоты, полученные с использованием клеток *R. jostii* ИЭГМ 60, являются

умеренно токсичными (3 класс токсичности), мало опасными (IV класс опасности) для окружающей природной среды и не проявляют фитотоксических свойств.

2. Продукты биодеструкции ацетилсалициловой кислоты проявляют слабую антиоксидантную активность по сравнению с аскорбиновой кислотой.

3. Продукты биодеструкции ацетилсалициловой кислоты оказывают фитостимулирующее действие на тест-культуру – семена овса посевного. При этом величина фитозффекта зависит от концентрации фумаровой кислоты в их составе.

4. Продукты биодеструкции ацетилсалициловой кислоты за счет наличия в их составе фумаровой кислоты оказывают положительный эффект на динамику накопления флавоноидов в траве зверобоя продырявленного. Нативная фумаровая кислота (0,015 %) увеличивает концентрацию флавоноидов в траве зверобоя продырявленного на 33% по сравнению с контролем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана возможность получения из ацетилсалициловой кислоты микробиологическим способом биологически активного продукта – фумаровой кислоты, обладающего фитостимулирующими свойствами. Данный продукт может быть использован как стимулятор роста лекарственных растений и индуктор накопления в них биологически активных веществ.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны методики хроматографического анализа ацетилсалициловой кислоты и ее бактериальных метаболитов, пригодные для динамической идентификации продуктов и определения остаточного содержания ацетилсалициловой кислоты в процессе биодеструкции.

2. Установлен химический состав бактериальных метаболитов ацетилсалициловой кислоты. Показано, что процесс биодеструкции ацетилсалициловой кислоты клетками *R. jostii* ИЭГМ 60 в зависимости от pH может происходить по двум метаболическим путям: по пути образования пирокатехина и *цис*, *цис*-муконовой кислоты, либо по пути образования гентизиновой кислоты, превращающейся на конечных этапах в фумаровую кислоту. Определены факторы, влияющие на параметры скорости процесса биодеструкции и период полураспада ацетилсалициловой кислоты.

3. Показано, что продукты биодеструкции ацетилсалициловой кислоты являются умеренно токсичными (3 класс токсичности), относятся к IV классу опасности (мало опасные) для окружающей природной среды и проявляют слабую антиоксидантную активность по сравнению с аскорбиновой кислотой.

4. Продукты биодеструкции ацетилсалициловой кислоты оказывают положительный эффект на динамику накопления флавоноидов в траве зверобоя продырявленного, обусловленный присутствием в их составе фумаровой кислоты.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы : в 2 т: Пер. с англ. / Ред. Р. Кельнер, Ж. - М. Мерме, М. Отто, Г. М. Видмер. – Москва, Мир : ООО Изд-во АСТ, 2004. – Т. 1. – 608 с., Т.2. – 768 с.
2. Базельская конвенция о контроле за трансграничной перевозкой опасных отходов и их удалением (Базель, 22 марта 1989 г. (с поправками по состоянию на 8 октября 2005 г.). – Текст: электронный // www.garant.ru [сайт]. –URL : <https://base.garant.ru/10108585/> [дата обращения : 19.07.2019].
3. Баранова, А. А. Кинетическое моделирование биомеханических процессов / А. А. Баранова, А. А. Селянинов, Е. В. Вихарева // Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Механика. – Пермь, 2012. – № 3. – С. 725.
4. Баренбойм, Г. М. Загрязнение природных вод лекарствами / Г. М. Баренбойм, М. А. Чиганова. – Москва: Наука, 2015. – 283 с.
5. Биодеструкция дротаверина гидрохлорида как случайный нестационарный процесс / А. А. Селянинов, А. А. Баранова, Е. В. Вихарева, М. И. Рычкова // Биофармацевтический журнал. – 2017. – Т. 9, № 1. – С. 26-31.
6. Борисевич, С. Н. Поиск спецсистемы для ТСХ разделения препаратов группы анальгетиков при их химико-токсикологическом исследовании / С. Н. Борисевич // Сборник научных трудов «Здоровье и окружающая среда». – 2009. – Вып. 13. – С. 269-272.
7. Вероятностная постановка и решение задачи интенсификации процесса биодеструкции лекарственных средств / А. А. Селянинов, Е. В. Вихарева, А. А. Баранова, И. И. Мишенина // Российский журнал биомеханики. – 2017. – Т. 21, № 1. – С.74-87.
8. Вихарева, Е. В. Классификатор фармацевтических отходов (непригодных к использованию лекарственных средств) по классам опасности для окружающей природной среды и рекомендации по их уничтожению / Е. В. Вихарева. – Пермь: ПГФА, 2008. – 118 с.

9. Вихарева, Е. В. Непригодные к использованию лекарственные средства: научно-методологические основы утилизации : специальность : 15.00.01, 15.00.02 : автореферат диссертации доктора фармацевтических наук / Вихарева Елена Владимировна. – Пермь, 2009. – 22 с.

10. Влияние вспомогательных веществ таблеток на биодеструкцию парацетамола / Е. В. Вихарева, И. И. Мишенина, М. И. Рычкова, И. Б. Ившина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2008. – № 3. – С. 25-28.

11. ГОСТ 32627-2014. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Наземные растения. Испытание на фитотоксичность : межгосударственный стандарт : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 24 сентября 2014 г. № 1209-ст : введен впервые : дата введения 2015-06-01. – Москва : Стандартиформ, 2015. – 20 с.

12. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд. – Т. 1. – Москва: ФЭМБ, 2018. – С. 6074-6083. – URL : http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_4/HTML/891/index.html. – Текст : электронный [дата обращения: 20.08.2019].

13. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд. – Т. 2. – Москва: ФЭМБ, 2018. – С. 894-910. – URL : http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/897/index.html. – Текст : электронный [дата обращения : 20.08.2019].

14. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд. Т. 3. – Москва: ФЭМБ, 2018. – С. 2361-2364. – URL : http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/547/index.html. – Текст : электронный [дата обращения : 20.08.2019].

15. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд. – Т. 4. – Москва: ФЭМБ, 2018. – С. 3413-3416. – URL :

http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_3/HTML/151/index.html. – Текст : электронный [дата обращения: 20.08.2019].

16. Гусева, А. Ю. Влияние продуктов биодеструкции парацетамола на сухую биомассу и содержание эфирного масла в листьях мяты перечной / А. Ю. Гусева, И. И. Мишенина // Вестник ПГФА. – 2016. – № 17. – С. 68-70.

17. Деградация парацетамола с истекшим сроком годности свободными клетками актинобактерий / И. Б. Ившина, М. И. Рычкова, Е. В. Вихарева [и др.] // Катализ в промышленности. – 2006. – № 2. – С. 44-49.

18. Идентификация компонентов комплексного лекарственного средства Но-шпалгин и продуктов их биодеструкции в культуральных жидкостях родококков / А. Н. Плотников, А. Н. Мухутдинова, И. И. Мишенина [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 9. – С. 1032-1037.

19. Использование градиентного варианта высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения компонентов комплексного лекарственного средства Но-шпалгин и продуктов их биологической деструкции в культуральных жидкостях родококков / А. Н. Плотников, Е. В. Вихарева, Е. Ю. Тумилович, М. И. Рычкова. – Текст : электронный // Современные проблемы науки и образования : [сайт]. – 2015. – № 2. – URL: <http://www.science-education.ru/129-21935> [дата обращения : 18.05.2019].

20. Использование тонкослойной хроматографии для идентификации продуктов биодеструкции салицилата натрия в культуральных средах родококков / А. Н. Хренков, Е. В. Вихарева, И. И. Мишенина, М. И. Рычкова // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Химия. – 2018. – № 4. – С. 181-187.

21. Исследование влияния продуктов биодеструкции парацетамола на морфометрические показатели и сухую биомассу листьев подорожника ланцетного / М. Ю. Коротаев, К. В. Скобелева, И. В. Рублева [и др.] // Вестник ПГФА. – 2015. – № 15. – С. 222-224.

22. Кинетическое моделирование процесса бактериальной деструкции кодеина фосфата / А. А. Селянинов, Е. В. Вихарева, А. Н. Плотников [и др.] // Здоровье и образование в 21 веке. – 2017. – № 9. – С. 200-203.

23. Клунко, Н. С. Управление отходами фармацевтического производства в контексте проблем рационального природопользования / Н. С. Клунко // Материалы международной 32 научной конференции «Экономическая наука и практика». – Чита, 2012. – С. 32-37.

24. Кокорина, Н. О. Определение лекарственных препаратов в биожидкостях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Н. О. Кокорина, В. П. Новоселов, М. А. Ханина // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – № 4. – С. 51-53.

25. Колла, В. Э. Дозы лекарственных средств и химических соединений для лабораторных животных / В. Э. Колла, Б. Я. Сыропятов. – Москва: Медицина, 1998. – 155 с.

26. Коротаев, М. Ю. Химическая структура и фиторегулирующее действие продуктов бактериальной деструкции парацетамола: специальность 15.00.02 : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук: защищена 22.04.2016 / Коротаев Михаил Юрьевич. – Пермь, 2016. – 127 с.

27. Кропоткина, В. В. Влияние сверхмалых доз органических кислот на рост и развитие ряда двудольных растений : специальность 03.00.16 : диссертация кандидата биологических наук: защищена 22.12.2009 / Кропоткина Валерия Валерьевна. – Барнаул, 2009. – 119 с.

28. Лебедев, А. С. Трансформация функционализированных карбоароматических соединений в модельных и природных системах : специальность 02.00.03 : диссертация кандидата химических наук: защищена 23.01.2015 / Лебедев Антон Сергеевич. – Ярославль, 2015. – 180 с.

29. Математическое моделирование процесса биодеструкции парацетамола актинобактериями рода *Rhodococcus* / Е. В. Вихарева, А. А.

Селянинов, И. Б. Ившина, Ю. И. Няшин // Российский журнал биомеханики. – 2007. – Т. 11, № 2. – С. 93-100.

30. Методические рекомендации 2.1.7.2297-07. Обоснование класса опасности отходов производства и потребления по фитотоксичности: издание официальное : утверждено Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 10 октября 2007 г. : введено впервые : дата введения 2007-12-28. – Москва, 2007. – 12 с.

31. Милушин, М. И. Уничтожение фальсифицированных лекарственных средств / М. И. Милушин // Аптечный бизнес. – 2006. – № 4. – С. 4-9.

32. Мишенина, И. И. Ростостимулирующее действие продуктов биодеструкции парацетамола на биомассу и морфометрические показатели листьев подорожника большого и ланцетного / И. И. Мишенина М. И. Рычкова, С. А. Соснина // Человек и лекарство: сб. материалов XXIII Российского Национального Конгресса (Москва, 11–14 апреля 2016 г). – Москва: Человек и лекарство, 2016. – С. 48.

33. Мишенина, И. И. Утилизация непригодных к медицинскому использованию лекарственных средств актинобактериями рода *Rhodococcus* (на примере парацетамола): специальность : 15.00.02 : диссертация кандидата фармацевтических наук : защищена 22.04.2008 / Мишенина Ирина Ивановна. – Пермь, 2008. – 125 с.

34. Мишенина, И. И. Фитостимулирующее действие продуктов биодеструкции парацетамола на мяту перечную (*Mentha piperita* L.) / И. И. Мишенина, М. И. Рычкова // Вестник ПГФА. – 2015. – № 16. – С. 77-78.

35. Молчанова, И. В. О возможности переработки лекарственных препаратов / И. В. Молчанова // Проблемы обращения с отходами лечебно-профилактических учреждений: материалы Российской научно-практической конференции. – Москва, 2001. – С. 59-60.

36. О порядке отпуска и уничтожения кодеинсодержащих лекарственных препаратов : Письмо Минздравсоцразвития России от

10.07.2012 № 2110595-25-1 // www.consultant.ru. – Текст : электронный [дата обращения : 12.09.2019].

37. Об обращении лекарственных средств : федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010, № 61-ФЗ (ред. от 02.08.2019) // <http://www.consultant.ru>. – URL : <http://www.consultant.ru/cons/cgi/online.cg>. – Текст : электронный [дата обращения : 24.11.2019].

38. Об утверждении Критериев отнесения отходов к I–V классам опасности по степени негативного воздействия на окружающую среду: приказ Минприроды России от 04 декабря 2014 г. № 536 // Консультант плюс. – URL : <https://www.consultant.ru> [дата обращения : 10.09.2019].

39. Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, которые после изъятия из незаконного оборота и обращения в доход государства могут быть переданы государственным унитарным предприятиям для промышленной переработки или уничтожения путем трансформации и ресинтеза с последующим их использованием в медицинских целях: приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 23.09.99, № 350 // Сборник основных нормативных актов по фармацевтической деятельности. – Москва, 2000. – 10 с.

40. Об утверждении Правил уничтожения недоброкачественных лекарственных средств, фальсифицированных лекарственных средств и контрафактных лекарственных средств : постановление Правительства РФ от 03.09.2010 № 674 (ред. от 16.01.2016) // www.consultant.ru. – Текст : электронный [дата обращения : 12.09.2019].

41. Определение кодеина фосфата в культуральной жидкости родококков методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / А. Н. Плотников, Ю. Н. Карпенко, Е. В. Вихарева [и др.] // Вестник Московского университета. Серия Химия. – 2018. – Т. 59, № 1. – С. 50-55.

42. Определение салицилата натрия и продуктов его биодеструкции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / А. Н. Хренков, Е.

В. Вихарева, Е. В. Тумилович [и др.] // Биофармацевтический журнал. – 2019. – Т. 11, № 1. – С. 31-35.

43. Патент № 2093030 Российская Федерация, МПК А01N 37/06. Ростостимулирующее средство для предпосевной обработки семян брюквы : заявл. 03.04.1995; опубл. 20.10.1997 / Мартынова Т. Н., Власов Б. Я., Хакимова Г. О., Долгополов А. А. – URL : https://patents.s3.yandex.net/RU2093030C1_19971020.pdf [дата обращения: 12.01.2019].

44. Патент № 2183636 Российская Федерация, МПК А61К 31/485. Способы получения 14-гидроксиноморфинонов, промежуточные соединения : заявл. 10.07.1998; опубл. 20.06.2002 / Шан Б., Арис Х.; Янсонг Лу, Бен-Ий Джи. – URL : <http://allpatents.ru/patent/2183636.html> [дата обращения : 12.01.2019].

45. Предозонирование как средство интенсификации процессов биологической очистки сточных вод / А. А. Цхе, В. А. Хан, В. Ф. Мышкин [и др.] – Текст : электронный // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета: научный журнал КубГАУ. – 2013. – № 87. – URL : <http://ej.kubagro.ru/2013/03/pdf/38.pdf> [дата обращения : 18.05.2019].

46. Прозоровский, В. В. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки / В. В. Прозоровский, М. П. Прозоровская, В. М. Демченко // Фармакология и токсикология. – 1978. – Т. 41, № 4. – С. 497-502.

47. Разработка методики количественного определения ацетилсалициловой кислоты и ее основного метаболита методом ВЭЖХ с УФ детектированием / В. Ю. Белов, С. В. Курсаков, В. И. Севастьянов [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – № 2. – С. 40-44.

48. Регистр лекарственных средств России РЛС. – Текст: электронный. – URL: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_58.htm. [дата обращения: 14.06.2019].

49. Салахов, И. А. Унифицированные подходы к анализу метаболитов, химиотерапевтических, анальгезирующих и противовоспалительных лекарственных средств методом ВЭЖХ: специальность 14.04.02: диссертация кандидата химических наук : защищена 01.04.2010 / Салахов Ильгиз Анясович. – Казань, 2010. – 176 с.

50. Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами: Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы СанПиН 2.1.7.2790-10: утверждены Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 09.12.2010 № 163 // www.consultant.ru. – Текст : электронный [дата обращения: 22.10.2019].

51. Селянинов, А. А. Время завершения кинетически моделируемых биомеханических процессов / А. А. Селянинов, А. А. Баранова, Е. В. Вихарева // Российский журнал биомеханики. – 2016. – Т. 20, № 4. – С. 368-377.

52. Сидоров, К. К. О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения / К. К. Сидоров // Токсикология новых промышленных веществ. – Москва, 1973. – С. 47-51.

53. Стимулирующее действие продуктов биотрансформации парацетамола на лекарственные растения / Е. Д. Гапечкина, И. И. Мишенина // Материалы LXXII Международной научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Актуальные проблемы современной медицины и фармации – 2018», (Минск, 17-22 апреля 2019 г.). – Минск, 2019. – С. 162.

54. Стохастический анализ повторяемости процесса биологической деструкции дротаверина гидрохлорида / А. А. Селянинов, Е. В. Вихарева, А. А. Баранова, Ю. Н. Карпенко // Российский журнал биомеханики. – 2013. – Т. 17, № 1 (59). – С. 41-54.

55. Токсические свойства продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты / А. Н. Хренков, М. Д. Скакодуб, И. П. Рудакова М. И. Рычкова // Вестник ПГФА. – 2018. – № 22. – С. 110-111.

56. Фармацевтические соединения на основе азотсодержащих гетероциклов – новый класс загрязнителей окружающей среды (обзор) / А. Н. Мухутдинова, М. И. Рычкова, Е. А. Тюмина, Е. В. Вихарева // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2015. – С. 65-76.

57. Хренков, А. Н. Идентификация продуктов биодеструкции таблетированной лекарственной формы ацетилсалициловой кислоты / А. Н. Хренков, М. Д. Скакодуб, Е. А. Леденева // Вестник ПГФА. – 2018. – № 21. – С. 163-164.

58. Хренков, А. Н. Исследование продолжительности процесса бактериальной деструкции салицилата натрия / А. Н. Хренков, Е. В. Вихарева // Санкт-Петербургские научные чтения (Санкт-Петербург, 6-8 декабря 2017). – Санкт-Петербург, 2018. – С. 419.

59. Хренков, А. Н. Исследование продуктов бактериальной деструкции салицилата натрия методом тонкослойной хроматографии / А. Н. Хренков, Е. В. Вихарева, И. И. Мишенина // XXIV Каргинские чтения: материалы Всероссийской научно-технической конференции молодых ученых «Физика, химия и новые технологии» (Тверь, ТвГУ, 23 марта 2017). – Тверь, 2017. – С. 122.

60. Хренков, А. Н. Исследование токсичности продуктов бактериальной деструкции салицилата натрия / А. Н. Хренков, Е. В. Вихарева, И. П. Рудакова // Человек и лекарство: сб. материалов XXVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство» (Москва, 8–11 апреля 2019 г.). – Москва: Человек и лекарство, 2019. – С. 141.

61. Хренков, А. Н. Фитостимулирующее действие производных фенола на лекарственные растения / А. Н. Хренков, Е. В. Вихарева // Вестник ПГФА. – 2016. – № 18. – С. 160-162.

62. Хренков, А. Н. Хроматографический анализ и кинетическое моделирование процесса биодеструкции ацетилсалициловой кислоты / А. Н. Хренков, Е. В. Вихарева // Высокие технологии, определяющие качество жизни (Пермь, 17–19 сентября 2018). – С. 130-132.

63. Хренков, А. Н. Деструктирующая активность родококков в отношении ацетилсалициловой кислоты / А. Н. Хренков, Е. В. Вихарева, М. И. Рычкова // Вестник ПГФА. – 2019. – № 24. – С. 111-114.

64. Чиганова, М.А. Влияние поступления ксенобиотиков на качество вод (на примере водных объектов-источников питьевого водоснабжения г. Москвы): автореф. дис.... канд. геогр. наук: 25.00.36 / Чиганова Мария Алексеевна. – Москва, 2013. – 22 с.

65. Числовые характеристики кинетически моделируемого простого нестационарного случайного процесса / А. А. Селянинов, М. А. Осипенко, А. А. Баранова [и др.] // Прикладная математика и вопросы управления. – 2019. – № 3. – С. 65-83.

66. A Comprehensive Working, Principles and Applications of Thin Layer Chromatography / D. L. Bipin, S. P. Anita, M. P. Hariprasad [et al.] // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2014. – N. 5. – P. 486-503.

67. A Human Health Risk Assessment of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment / L. J. Schulman, E. V. Sargent, B. D. Naumann [et al.] // Human and Ecological Risk Assessment. – 2002. – Vol. 8, N. 4. – P. 657-680.

68. A Review on Pharma Pollution / K. Shalini, Z. Anwer, P. K. Sharma [et al.] // International Journal of Pharm Tech Research. – 2010. – Vol. 2, N. 4. – P. 2265-2270.

69. A Simple and cost-effective TLC-densitometric method for the quantitative determination of acetylsalicylic acid and ascorbic acid in combined effervescent tablets / A. Pyka-Paj, M. Dołowy, W. Parys, K. Bober, G. Janikowska // Molecules. – 2018. – Vol. 23, N. 3115. – P. 1-17.

70. A simplified thin-layer chromatography system for the detection of commonly abused basic drugs / J. Blakesley, D. M. Wood, C. Howse, J. Spencer-Peet // Annals of Clinical Biochemistry. – 1987. – Vol. 24, N. 5. – P. 508-510.

71. Ashton, D. Investigation the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom / D. Ashton, M. Hilton, K. V.

Thomas // Journal Science of the Total Environment. – 2004. – Vol. 333. – P. 167-184.

72. Baena-Nogueras, R. M. Degradation kinetics of pharmaceuticals and personal care products in surface waters: photolysis vs biodegradation / R. M. Baena-Nogueras, E. González-Mazo, P. A. Lara-Martín // Science of the Total Environment. – 2017. – Vol. 590–591. – P. 643-654.

73. Bahadir, A. M. Pharmaceuticals and personal care products in the environment / A. M Bahadir, G. Duca // The role of ecological chemistry in pollution research and sustainable development. – 2009. – P. 27-35.

74. Baker, D. R. Multi-residue determination of the sorption of illicit drugs and pharmaceuticals to wastewater suspended particulate matter using pressurised liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry / D. R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern // Journal of Chromatography A. – 2011. – Vol. 1218, N. 44. – P. 7901-7913.

75. Barron, L. Multi-residue determination of pharmaceuticals in sludge and sludge enriched soils using pressurized liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry / L. Barron, J. Tobin, B. Paull // Journal of Environmental Monitoring. – 2008. – Vol. 10, N. 3. – P. 353-361.

76. Bessems, J. G. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches / J.G. Bessems, N.P. Vermeulen // Critical Reviews in Toxicology. – 2001. – Vol. 31, N. 1. – P. 55-138.

77. Biodegradation and metabolic pathway of sulfamethoxazole by *Pseudomonas psychrophila* HA-4, a newly isolated cold-adapted sulfamethoxazole-degrading bacterium / B. Jiang, A. Li, D. Cui [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2013. – Vol. 98, N. 10. – P. 4671-4681.

78. Biodegradation of Bulk Drug Industrial Effluents by Microbial Isolates from Soil / B. P. Ajay, K. M. Sitaram, R. D. Ganesh [et al.] // Journal of Scientific & Industrial Research. – 1999. – Vol. 58. – P. 431-435.

79. Biodegradation of catechols by micro-organisms – A short review / Md. Zeyauallah, A. S. Abdelkafe, W. B. Zabya, A. Ali // *African Journal of Biotechnology*. – 2009. – Vol. 8, N. 13. – P. 2916-2922.
80. Biodegradation of drotaverine hydrochloride by free and immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 608 / I. B. Ivshina, E. V. Vikhareva, M. I. Richkova [et al.] // *World Journal Microbiological Biotechnology*. – 2012. – Vol. 28. – P. 2997-3006.
81. Biodegradation of pharmaceuticals in hospital wastewater by staged Moving Bed Biofilm Reactors (MBBR) / M. E. Casas, R. K. Chhetri, G. Ooi [et al.] // *Water Research*. – 2015. – Vol. 83. – P. 293-302.
82. Biodegradation of phenol, salicylic acid, benzenesulfonic acid, and iomeprol by *Pseudomonas fluorescens* in the capillary fringe / N. Hack, C. Reinwand, G. Abbt-Braun [et al.] // *Journal of Contaminant Hydrology*. – 2015. – Vol. 183. – P. 40-54.
83. Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR / E. Marco-Urrea, M. Pérez-Trujillo, P. Blánquez [et al.] // *Bioresource Technology*. – 2011. – Vol. 101, N. 7. – P. 2159-2166.
84. Biosynthesis of drug metabolites using microbes in hollow fiber cartridge reactors: Case study of diclofenac metabolism by *Actinoplanes* species / A. Osorio-Lozada, S. Surapaneni, G. L. Skiles, R. Subramanian // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2008. – Vol. 36, N. 2. – P. 234-240.
85. Biotransformation of three pharmaceutical active compounds by the fungus *Phanerochaete chrysosporium* in a fed batch stirred reactor under air and oxygen supply / A. Rodarte-Morales, G. Feijoo, M. Moreira, M. Lema // *Biodegradation*. – 2012. – Vol. 23, № 1. – P. 145-156.
86. Biotransformations of morphine alkaloids by fungi: N-demethylations, oxidations, and reductions / V. Chaudhary, G. L. Hannes, A. Moudra [et al.] // *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. – 2009. – Vol. 74, N. 7. – P. 1179-1193.

87. Bo, L. Biodegradation of trace pharmaceutical substances in wastewater by a membrane bioreactor / L. Bo, T. Urase, X. Wang // *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China*. – 2009. – Vol. 3, N. 2. – P. 236-240.
88. C^{13} -NMR analysis of glucose metabolism during citric acid production by *Aspergillus niger* / A. Peksel, N. Torres, J. Liu [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2002. – Vol. 58. – P. 157-163.
89. Caracciolo, A. B. Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. A review / A. B. Caracciolo, E. Topp, P. Grenni // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2015. – Vol. 106. – P. 25-36.
90. Catalysis of the biodegradation of unusable medicines by Alkanotrophic rhodococci / I. B. Ivshina, M. I. Rychkova, E. V. Vikhareva [et al.] // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2006. – Vol. 42, N. 4. – P. 392-395.
91. Celiz, M. D. Pharmaceutical metabolites in the environment: analytical challenges and ecological risks / M. D. Celiz, J. Tso, D. S. Aga // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2009. – Vol. 28, N. 12. – P. 2473-2484.
92. Chaudhary, V. Fungal Biotransformation of Morphine Alkaloids // Dissertation, Brock University St. Catharines, Ontario. – 2009. – P. 1-98.
93. Chèvre, N. Pharmaceuticals in surface waters: sources, behavior, ecological risk, and possible solutions. Case study of Lake Geneva, Switzerland / N. Chèvre // *WIREs Water*. – 2014. – Vol. 1. – P. 69-86.
94. Choudhary, J. Biodegradation of salicylic acid from soil isolates/ J. Choudhary, P. Chauhan, M. Gahlout, H. Prajapati // *International Journal of Drug Research and Technology*. – 2016. – Vol. 6. – P. 107-114.
95. Chrastil, J. Quantitative estimation of salicylic acid and its metabolites by thin-layer densitometry / J. Chrastil, J. T. Wilson // *Journal of Chromatography*. – 1978. – № 152. – P. 183-189.
96. Chromatographic determination of drotaverine hydrochloride and kinetic modeling of the process of its biodestruction in a *Rhodococcus*

rhodochrous culture liquid / Y. N. Karpenko, A. A. Selyaninov, A. N. Mukhutdinova [et al.] // Journal of Analytical Chemistry. – 2014. – Vol. 69, N. 7. – P. 681-685.

97. Civilini, M. Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* 2NR degrading naphthalene / M. Civilini, M. Bertoldi, G. Tell // Letters in Applied Microbiology. – 1999. – N. 29. – P. 181-186.

98. Collapse of a fish population after exposure to synthetic estrogen / K. A. Kidd, P. J. Blanchfield, K. H. Mills [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2007. – Vol. 104, N. 21. – P. 8897-8901.

99. Comparative Bioavailability Study of Two 81 mg Coated Tablet Formulations of Acetylsalicylic Acid in Fasting Healthy Volunteers / D. Rc, N. J. Antunes, R. A. Moreno [et al.] // Journal of Bioequivalence & Bioavailability. – 2017. – Vol. 9. – P. 477-483. DOI: 10.4172/jbb.1000348.

100. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods / A. Floegel, D. Kim, S. Chung [et al.] // Journal of Food Composition and Analysis. – 2011. – Vol. 24. – P. 1043-1048.

101. Coop, A. Studies into the direct oxidation of codeinone to 14-hydroxycodeinone. / A. Coop, K. C. Rice // Tetrahedron. – 1999. – Vol. 55. – P. 11429-11436.

102. Daughton, C. G. Illicit Drugs: Contaminants in the Environment and Utility in Forensic Epidemiology / C. G. Daughton // Springer Science + Business Media. – 2011. – Vol. 210. – P. 59-110.

103. Deepika, P. P. Analysis of Illicit Drugs, Their Metabolites and Other Micropollutants in Water by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry // Dissertation, Loyuola Uniersity Chicago. – 2012. – P. 1-71.

104. Degradation of acetaminophen by *Delftia tsuruhatensis* and *Pseudomonas aeruginosa* in a membrane bioreactor / D. G. Bart, V. Lynn, V. Willy, B. Nico // Water Research. – 2011. – Vol. 45, N. 4. – P. 1829-1837.

105. Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium / L. Zhang, J. Hu, R. Zhu [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2012. – Vol. 97, N. 8. – P. 3687-3698.

106. Deo, R. P. Pharmaceuticals in the Built and Natural Water Environment of the United States / R. P. Deo, R. U. Halden // *Water*. – 2013. – Vol. 5. – P. 1346-1365.

107. Determination of acetylsalicylic acid and its major metabolite, salicylic acid, in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic study of Astrix® in Korean healthy volunteers / S. K. Bae, K. A. Seo, E. J. Jung [et al.] // *Biomedical chromatography*. – 2008. – N. 22. – P. 590-595.

108. Determination of pharmaceutical compounds in surface and underground water by solid phase extraction–liquid chromatography / O. J. Olaitan, C. Anyakora, T. Bamiro, A. T. Tella // *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*. – 2014. – Vol. 6. – P. 20-26.

109. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review / M. Blessy, R. D. Patel, P. N. Prajapati, Y. K. Agrawal // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2014. – Vol. 4, N. 3. – P. 159-165.

110. Dhulipala, R. Estimation and Biodegradation of Acetylsalicylic Acid in Contaminated Waste Water using ASP and UASB [Electronic resource] / R. Dhulipala, V. Venkateswar, Y. Gangadhar // *International Journal of Science and Research*. – 2015. – Vol. 5. – P. 1842-1847. – URL : <https://www.ijsr.net/archive/v5i12/ART20163864.pdf> [дата обращения : 21.05.2019].

111. Diclofenac residues as the cause of vulture population declines in Pakistan. / J. L. Oaks, M. Gilbert, M. Z. Virani [et al.] // *Nature*. – 2004. – Vol. 427. – P. 630-633.

112. Drotaverine hydrochloride degradation using cyst-like dormant cells of *Rhodococcus ruber* / I. B. Ivshina, A. N. Mukhutdinova, H. A. Tyumina [et al.] // *Current Microbiology*. – 2015. – Vol. 70, N. 3. – P. 307-314.

113. Ecotoxicological effects of salicylic acid in the freshwater fish *Salmo trutta fario*: antioxidant mechanisms and histological alterations / B. Nunes, J. C. Campos, R. Gomes [et al.] // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2015. – N. 22. – P. 667-678.

114. Effect of salicylic acid on *Fusarium graminearum*, the major causal agent of *fusarium* head blight in wheat / P. Qi, A. Johnston, M. Balcerzak [et al.] // *Fungal Biology*. – 2012. – Vol. 116. – P. 413-426.

115. Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds / P. E. Stackelberg, J. Gibs, E. T. Furlong [et al.] // *Science of the Total Environment*. – 2007. – Vol. 377. – P. 255-272.

116. Emerging contaminants in groundwater / M. Stuart, K. Manamsa, J. C. Talbot, E. J. Crane // *British Geological Survey Open Report*. – 2011. – 123 p.

117. Enrichment of bacterial strains for the biodegradation of diclofenac and carbamazepine from activated sludge / V. S. Bessa I. S. Moreira, M. E. Tiritan, P. M. L. Castro // *International Biodeterioration and Biodegradation*. – 2017. – Vol. 120. – P. 135-142.

118. Environmental and health hazards due to pharmaceutical effluents / V. Chander, P. Singh, B. Sharma [et al.] // *International Journal of Pharmacy Review & Research*. – 2014. – Vol. 75, N. 2. – P. 100-103.

119. Fate and uptake of pharmaceuticals in soil-plant systems / L. J. Carter, E. Harris, M. Williams [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2014. – Vol. 62, N. 4. – P. 816-825.

120. Fatta-Kassinos, D. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: Current state of knowledge and future research / D. Fatta-Kassinos, S. Meric, A. Nikolaou // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2011. – Vol. 399, N. 1. – P. 251–275.

121. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346 / I. B. Ivshina, E. A. Tyumina, M. V. Kuzmina, E. V. Vikhareva // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – P. 1–13. DOI: 10.1038/s41598-019-45732-9.

122. Fendric, A. M. OTC analgesics and drug interactions: clinical implications. – [Electronic resource] / A. M. Fendric, D. E. Pan, G. E. Johnson // Osteopathic Medicine and Primary Care– 2008. – Vol. 7, N. 2. – URL : <https://doi.org/10.1186/1750-4732-2-2> [дата обращения : 15.08.2019].

123. Fent, K. Ecotoxicology of human pharmaceuticals / K. Fent, A. A. Weston, D. Caminada // Aquatic Toxicology. – 2006. – Vol. 76. – P. 122-1591.

124. Ford, B. Evaluating Pharmaceutical Sorption to Soils and Ground Water from an Eastern North Carolinian Family Farm / B. Ford // Proceedings Of The National Conferences On Undergraduate Research (NCUR) University of Kentucky (April 3–5, 2014). – Lexington, 2014. – P. 40-44.

125. Fram, M.S. Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California / M. S. Fram, K. Belitz // Science of the Total Environment. – 2011. – Vol. 409. – P. 3409-3417.

126. Gauthier, H. Biodegradation of Pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* growing by Co-Metabolism / H. Gauthier, V. Yargeau, D. Cooper // Science of the Total Environment. – 2010. – Vol. 408. – P. 1701-1706.

127. Godfrey, E. Pharmaceuticals in On-Site Sewage Effluent and Ground Water, Western Montana / E. Godfrey, W. W. Woessner, M. J. Benotti // Ground Water. – 2007. – Vol. 45, N. 3. – P. 263-271.

128. Gros, M. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry / M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló // Journal of Chromatography A. – 2012. – Vol. 1248. – P. 104-121.

129. Gross-Sorokin, M.Y. Assessment of feminization of male fish in English rivers by the Environment Agency of England and Wales / M. Y. Gross-

Sorokin, S. D. Roast, G. C. Brighty. // *Environmental Health Perspectives*. – 2006. – Vol. 114. – P. 147-151.

130. Grujić, S. Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry / S. Grujić, T. Vasiljević, M. Lausević // *Journal of Chromatography A*. – 2009. – Vol. 1216, N. 25. – P. 4989-5000.

131. Grund, E. Naphthalene Degradation via Salicylate and Gentisate by *Rhodococcus* sp. Strain B4 / E. Grund, B. Denecke, R. Eichenlaub // *Applied and environmental microbiology*. – 1992. – Vol. 58, № 6. – P. 1874-1877.

132. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation / Center for Drug Evaluation and Research U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services, Rockville Maryland, 2001. – 10 p.

133. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft) / European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009. – 14 p.

134. Guzik, U. Intradioldioxygenases – The key enzymes in xenobiotics degradation / U. Guzik, K. Hupert-Kocurek, D. Wojcieszynska // *Biodegradation of hazardous and special products* / edited by R. Chamy, F. Rosenkranz. – Croatia: In Tech Rijeka, 2013. – P. 129-153.

135. Habe, H. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria / H. Habe, T. Omori // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. – 2003. – № 67. – P. 225-243.

136. Hadibarata, T. Biodegradation of Phenanthrene by Fungi Screened from Nature / T. Hadibarata, S. Tachibana, K. Iton // *Pakistan Journal of Biological Sciences*. – 2007. – № 15. – P. 2535-2543.

137. Hashem, H. A. Chromatographic Application on Calixarene Bonded Stationary Phases: A Stability Indicating Method for Simultaneous Determination of Paracetamol, Caffeine and Acetylsalicylic Acid in Excedrin Tablets / H. A. Hashem // *Chromatographia*. – 2010. – Vol. 71, N. 1. – P. 31-35.

138. Heberer, T. From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas / T. Heberer // *Water Science and Technology*. – 2002. – Vol. 46. – P. 81-88.

139. High activity catechol 1,2-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 as a useful tool in cis,cis-muconic acid production / U. Guzik, K. H. Kocurek, M. Sitnik, D. Wojcieszyn'ska // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2013. – N. 103. – P. 1297-1307.

140. Hospital Wastewater / K. Corre1, M. Katouli,, H. Stratton [et al.] // *Urban Water Security Research Alliance Technical Report*. – 2012. – N. 76. – 218 p.

141. Ishiyama, D. Novel Pathway of Salicylate Degradation by *Streptomyces* sp. Strain WA46. / D. Ishiyama, D. Vujaklija, J. Davies // *Applied and environmental microbiology*. – 2004. – Vol. 70, N. 3. – P. 1297-1306.

142. Ivshina, I. Biodegradation of emerging pollutants: Focus on pharmaceuticals / I. Ivshina, E. Tyumina, E. Vikhareva // *Microbiology Australia*. – 2018. – Vol. 39. – N. 3. – P. 117-122.

143. Kevin, V. T. Pharmaceuticals in the environment: The relevance of point sources / V. T. Kevin, K. Langford // *Norwegian Institute for Water Research, Sustainable Pharmacy*. – 2008. – P. 31.

144. Kevin, V. T. Point Sources of Human Pharmaceuticals into the Aquatic Environment / V. T. Kevin, K. Langford // *Green and Sustainable Pharmacy*. – 2010. – P. 211-223.

145. Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens / L. Lloret, G. Eibes, T. Lú-Chau [et al.] // *Biochemical Engineering Journal*. – 2010. – Vol. 51, N. 3. – P. 124-131.

146. Landis, M. S. The use of mixed-mode ion-exchange solid phase extraction to characterize pharmaceutical drug degradation / M. S. Landis // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2007. – Vol. 44, N. 5. – P. 1029-1039.

147. Larcher, S. Biodegradation of sulfamethoxazole by individual and mixed bacteria / S. Larcher, V. Yargeau // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 91. – P. 211-218.

148. Larkin, M. J. Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility / M. J. Larkin, L. A. Kulakov, C. C. R. Allen // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2005. – Vol. 16. – P. 282-290.

149. List of species and strains of IEGM Collection [Электронный ресурс] / IEGM Regional Specialised Collection of Alkanotrophic Microorganisms // Режим доступа: <http://www.iegmcol.ru/strains/index.html> [05.07.2019].

150. Marchlewicz, A. Over-the-Counter Monocyclic Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Environment–Sources, Risks, Biodegradation / A. Marchlewicz, U. Guzik, D. Wojcieszynska // *Water, Air & Soil Pollution*. – 2015. – Vol. 226, N. 355. – P. 1-13.

151. Membrane transport system and the biodegradation potential and pathogenicity of genus *Rhodococcus* [Electronic resource] / C. C. C. R. de Carvalho, S. S. Costa, P. Fernandes [et al.] // *Frontiers in Physiology*. – 2014. – Vol. 5, N. 133. – URL : <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2014.00133> [дата обращения : 15.08.2019].

152. Metabolism of 2-, 3- and 4-hydroxybenzoates by soil isolates *Alcaligenes* sp. strain PPH and *Pseudomonas* sp. strain PPD / J. Deveryshetty, V. Suvkbal, G. Varadamshetty, P. S. Phale // *FEMS Microbiology Letters*. – 2007. – Vol. 268. – P. 59-66.

153. Modelling the biodegradation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by activated sludge and a pure culture / B. Almeida, A. Oehmen, R. Marques [et al.] // *Bioresource Technology*. – 2013. – Vol. 133. – P. 31-37.

154. Mohammed, S. S. Comparative Analytical Study for Determination of Acetylsalicylic Acid in Bulk and in Pharmaceutical Formulations / S. S. Mohammed // *Journal of Al-Nahrain University*. – 2013. – Vol. 16. – P. 1-10.

155. Moldovan, Z. Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania / Z. Moldovan // *Chemosphere*. – 2006. – Vol. 64. – P. 1808-1817.

156. Mompelat, S. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water / S. Mompelat, B. Le Bot, O. Thomas // *Environment International*. – 2009. – Vol. 35, N. 5. – P. 803-814.

157. Monteiro, S. C. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment. Factors Affecting the Degradation of Pharmaceuticals in Agricultural Soils / S. C. Monteiro, A. B. A. Boxall // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2009. – Vol. 28, N. 12. – P. 2546-2554.

158. Moore, C. M. Rapid extraction of anti-inflammatory drugs in whole blood for HPLC analysis / C. M. Moore, I. R. Tebbett // *Forensic Science International*. – 1987. – Vol. 34, N. 1. – P. 155-158.

159. Narvaez, J. Pharmaceutical products in the environment: sources, effects and risks / J. Narvaez, C. C. Jimenez // *Vitae, Revista de la facultad de química farmaceutica*. – 2012. – Vol. 19, N. 1. – P. 93-108.

160. Nikolaou, A. Pharmaceuticals and related compounds as emerging pollutants in water: analytical aspects / A. Nikolaou // *Global NEST Journal*. – 2013. – Vol. 15, N. 1. – P. 1-12.

161. Novel metabolic pathway for salicylate biodegradation via phenol in yeast *Trichosporon moniliiforme* / Y. Iwasaki, H. Gunji, K. Kino [et al.] // *Biodegradation*. – 2009. – Vol. 21. – P. 557-564.

162. Occurrence, fate, and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review / B. Halling-Sørensen, S. N. Nielsen, P. F. Lanzky [et al.] // *Chemosphere*. – 2002. – Vol. 35. – P. 357-393.

163. Penn, C. D. Salicylate degradation by the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* / C. D. Penn, S. L. Daniel // *Current Microbiology*. – 2013. – Vol. 67, N. 2. – P. 218-225.

164. Perneger, T. V. Risk of kidney failure associated with the use of acetaminophen, aspirin, and nonsteroidal antiinflammatory drugs / T. V. Perneger,

P. K. Whelton, M. J. Klag // *The New England Journal Of Medicine*. – 1994. – Vol. 331. – P. 1675-1712.

165. Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: A review / Q. Bu, B. Wang, J. Huang [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2013. – Vol. 262. – P. 189-211.

166. Pharmaceuticals in the environment – global occurrences and perspectives. / T. Beek, F.A. Weber, A. Bergmann [et al.] // *Environmental Chemistry & Toxicology*. – 2016. – Vol. 35, N. 4. – P. 823-835.

167. 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 [et al.] // *Environmental Science & Technology*. – 2002. – Vol. 36, N. 6. – P. 1202-1211.

168. Photodegradation of salicylic acid in aquatic environment: Effect of different forms of nitrogen / G. Wang, G. Liu, H. Liu [et al.] // *Science of the Total Environment*. – 2012. – Vol. 436. – P. 573-577.

169. Physiological role of NahW, the additional salicylate hydroxylase found in *Pseudomonas stutzeri* AN10 / M. P. Lanfranconi, J. A. Christie-Oleza, C. Martin-Cardona [et al.] // *FEMS Microbiology Letters*. – 2009. – Vol. 300. – P. 265-272.

170. Pollution Pathways of Pharmaceutical Residues in the Aquatic Environment on the Island of Mallorca, Spain / C. Rodríguez-Navas, E. Björklund, S. A. Bak [et al.] // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2013. – Vol. 65. – P. 56-66.

171. Pollution-induced community tolerance to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in fluvial biofilm communities affected by WWTP effluents / N. Corcoll, V. Acuña, D. Barceló [et al.] // *Chemosphere*. – 2014. – Vol. 112. – P. 185-193.

172. Prajapati, R. P. Pharmaceutical toxicity on Environment / R. P. Prajapati, D. R. Tiwari // *International Journal of Fundamental & Applied Research*. – 2013. – Vol. 1, N. 1. – P. 6-9.

173. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy / G. M. Lalumera, D. Calamari, P. Galli [et al.] // *Chemosphere*. – 2004. – Vol. 54. – P. 661-668.

174. Qualitative detection of the NSAIDs diclofenac and ibuprofen in the hair of Eurasian otters (*Lutra lutra*) occupying UK waterways with GC–MS. / N. L. Richards, G. Cook, V. Simpson [et al.] // *European Journal of Wildlife Research*. – 2011. – Vol. 57, N. 5. – P. 1107-1114.

175. Quinn, B. Evaluation of the acute, chronic and teratogenic effects of a mixture of eleven pharmaceuticals on the cnidarian, *Hydra attenuate* / B. Quinn, F. Gagne, C. Blaise // *Science of the Total Environment*. – 2009. – Vol. 407. – P. 1072-1079.

176. Quintana, J. Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor / J. Quintana, S. Weiss, T. Reemtsma // *Water Research*. – 2005. – Vol. 39. – P. 2654-2664.

177. Radjenovic, J. Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor // J. Radjenovic, M. Petrovic, D. Barcelo // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2007. – Vol. 387. – P. 1365-1377.

178. Ramos–Martos, N. Application of Liquid Chromatography to the Simultaneous Determination of Acetylsalicylic Acid, Caffeine, Codeine, Paracetamol, Pyridoxine, and Thiamine in Pharmaceutical Preparations / N. Ramos–Martos, F. Aguirre–Gómez, A. Molina–Díaz // *Journal of AOAC international*. – 2001. – Vol. 84, N. 3. – P. 676-682.

179. Removal and transformation of pharmaceuticals in wastewater treatment plants and constructed wetlands / E. Lee, S. Lee, J. Park [et al.] // *Drinking Water Engineering and Science*. – 2013. – Vol. 6. – P. 89-98.

180. Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus *Phanerochaete sortida* YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation / T. Hata, S. Kawai, H. Okamura, T. Nishida // *Biodegradation*. – 2010. – Vol. 21, N. 5. – P. 681-689.

181. Review of the Occurrence of Anti-infectives in Contaminated Wastewaters and Natural and Drinking Waters / P. A. Segura, M. François, C. Gagnon, S. Sauvé // *Environmental Health Perspective*. – 2009. – Vol. 117, N. 5. – P. 675-684.

182. Richardson, M. L. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment / M. L. Richardson, J. Bowron // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 1985. – Vol. 37, N. 1. – P. 1-12.

183. Rodriguez-Rodriguez, C. E. Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry and solid-phase *Trametes versicolor* systems / C. E. Rodriguez-Rodriguez, E. Marco-Urrea, G. Caminal // *Bioresource Technology*. – 2010. – Vol. 101, N. 7. – P. 2259-2266.

184. Salicylic acid degradation from aqueous solutions using *Pseudomonas fluorescens* hk44: parameters studies and application tools / T. R. Silva, E. Valdman, B. Valdman, S. G. F. Leite // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2007. – N. 38. – P. 39-44.

185. Santos, L. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment / L. Santos, A. Araujo, A. Fachini // *Journal of Hazardous Materials*. – 2010. – Vol. 175. – P. 45-95.

186. Singh, P. Pharmaceutical pollution: A short communication / P. Singh, B. Rani, R. Maheshwari // *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. – 2011. – Vol. 1, N. 2. – P. 26-30.

187. Skibinski, R. The stability and degradation kinetics of acetylsalicylic acid in different organic solutions revisited – an UHPLC–ESI-QTOF spectrometry study / R. Skibinski, L. Komsta // *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. – 2015. – Vol. 29, N. 1. – P. 39-41.

188. Snyder, S. A. Endocrine disruptors and pharmaceuticals: implications for water sustainability / S. A. Snyder, M. J. Benotti // *Water Science & Technology*. – 2010. – Vol. 61, N. 1. – P. 145-154.

189. Soil colonization by *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic materials: substrate selection and naproxen degradation / E. B. Borràs, G. Llorens-

Blanch, C. E. Rodríguez-Rodríguez [et al.] // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2011. – Vol. 65, N. 6. – P. 846-852.

190. Soudi, M. R. Bioremediation potential of a phenol degrading bacterium, *Rhodococcus erythropolis* SKO-1 / M. R. Soudi, N. Kolahchi // Progress in Biological Sciences. – 2011. – Vol. 1, N. 1. – P. 31-40.

191. Sumera, A. K. Degradation of 4-aminophenol by newly isolated *Pseudomonas sp.* strain ST-4 / A. K. Sumera, H. Muhammad, A. Safia // Enzyme and Microbial Technology. – 2006. – Vol. 38. – P. 10-13.

192. Ternes, T. A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers / T. A. Ternes // Water Research. – 1998. – Vol. 32. – P. 3245-3260.

193. The fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), endocrine disrupting contaminant (EDCs), metabolites and illicit drugs in a WWTW and environmental waters. / E. Archer, B. Petrie, B. Kasprzyk-Hordern, G.M. Wolfaardt // Chemosphere. – 2017. – Vol. 174. – P. 437-446.

194. The genus *Rhodococcus* / K. S. Bell, J. C. Philp, D. W. Aw, N. Christofi // Journal of applied microbiology. – 1998. – Vol. 85. – P. 195-210.

195. Toxic effects of the non-steroidae anti-inflammatory drug diclofenac. Part II: cytological effects in liver kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / R. Triebkorn, H. Casper, A. Heyd, [et al.] // Aquatic Toxicology. – 2004. – Vol. 68, N. 2. – P. 151-156.

196. Tran, N. H. Biodegradation characteristics of pharmaceutical substances by whole fungal culture *Trametes versicolor* and its laccase / N. H. Tran, T. Urase, O. Kusakabe // Journal of Water and Environment Technology. – 2010. – Vol. 8, N. 2. – P. 125-140.

197. Transformations of codeine to important semisynthetic opiate derivatives by *Pseudomonas putida* m 10 / D. L. Lister, G. Kanungo, D. A. Rathbone, N. C. Bruce // FEMS Microbiology Letters. – 1999. – Vol. 181. – P. 137-144.

198. Transformations of Morphine Alkaloids by *Pseudomonas putida* M10 / M. T. Long, A. M. Hailes, G. W. Kirby, N. C. Bruce. // Applied and environmental microbiology. – 1995. – Vol. 61, N. 10. – P. 3645-3649.

199. Two Independently Regulated Cytochromes P-450 in a *Rhodococcus* Strain That Degrades 2-Ethoxyphenol and 4-Methoxybenzoate / U. Karlson, D. F. Dwyer, S. W. Hooper [et al.] // Journal of Bacteriology. – 1993. – Vol. 175, N. 5. – P. 1467-1474.

200. Warhurst, A. M. Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus* / A. M. Warhurst, C. A. Fewson // Critical Reviews in Biotechnology. – 1994. – Vol. 14, N. 1. – P. 29-73.

201. Wu, S. Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms / S. Wu, L. Zhang, J. Chen // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2012. – Vol. 96, N. 4. – P. 875-884.

202. Zweiner, C. Occurrence and analysis of pharmaceuticals and their transformation products in drinking water treatment / C. Zweiner // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2007. – Vol. 387. – P. 1159-1162.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1

Лабораторный регламент

**получения продуктов бактериальной деструкции ацетилсалициловой
кислоты, содержащих фумаровую кислоту**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая
академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по НИР
ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России
Т.В. Бомбела Т.В. Бомбела
«16» *марта* 2020 г.



**ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ
ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ
АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ, СОДЕРЖАЩИХ
ФУМАРОВУЮ КИСЛОТУ**

Пермь 2020

Содержание

1. Характеристика конечной продукции
2. Химическая схема производства
3. Технологическая схема производства
4. Аппаратная схема производства и спецификации оборудования
5. Характеристика сырья, микроорганизмов и полученных продуктов
6. Изложение технологического процесса
7. Техника безопасности
8. Переработка и обезвреживание отходов производства
9. Контроль производства и управление технологическим процессом
10. Информационные материалы

Раздел 1

Характеристика конечной продукции

Постферментационная среда культивирования родококков светло-коричневого цвета, прозрачная, содержащая конечные продукты биодеструкции ацетилсалициловой кислоты (фумаровую кислоту).

Сухой остаток около 1%.

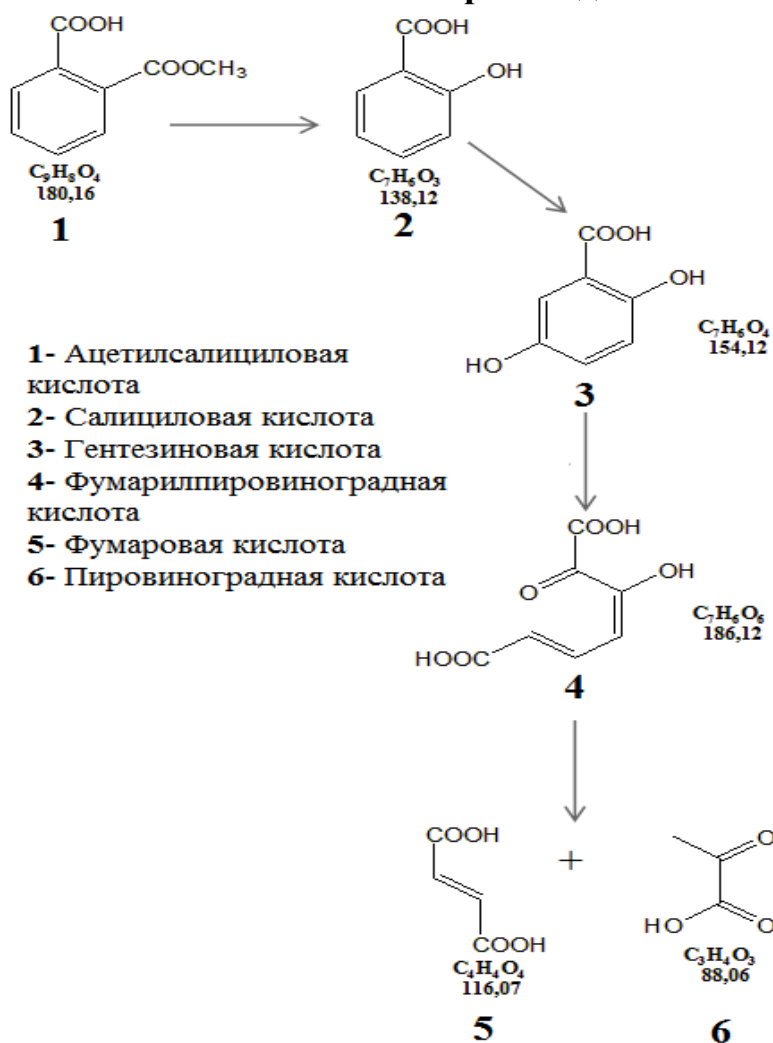
Значение pH среды в пределах от 6,7 до 7,2.

Продукт сохраняется в прохладном, защищённом от света месте в хорошо закупоренных стеклянных баллонах вместимостью 1 литр.

Действующим веществом продукта является фумаровая кислота. Продукт может использоваться как фитостимулирующий препарат, индуктор накопления БАВ в лекарственных растениях.

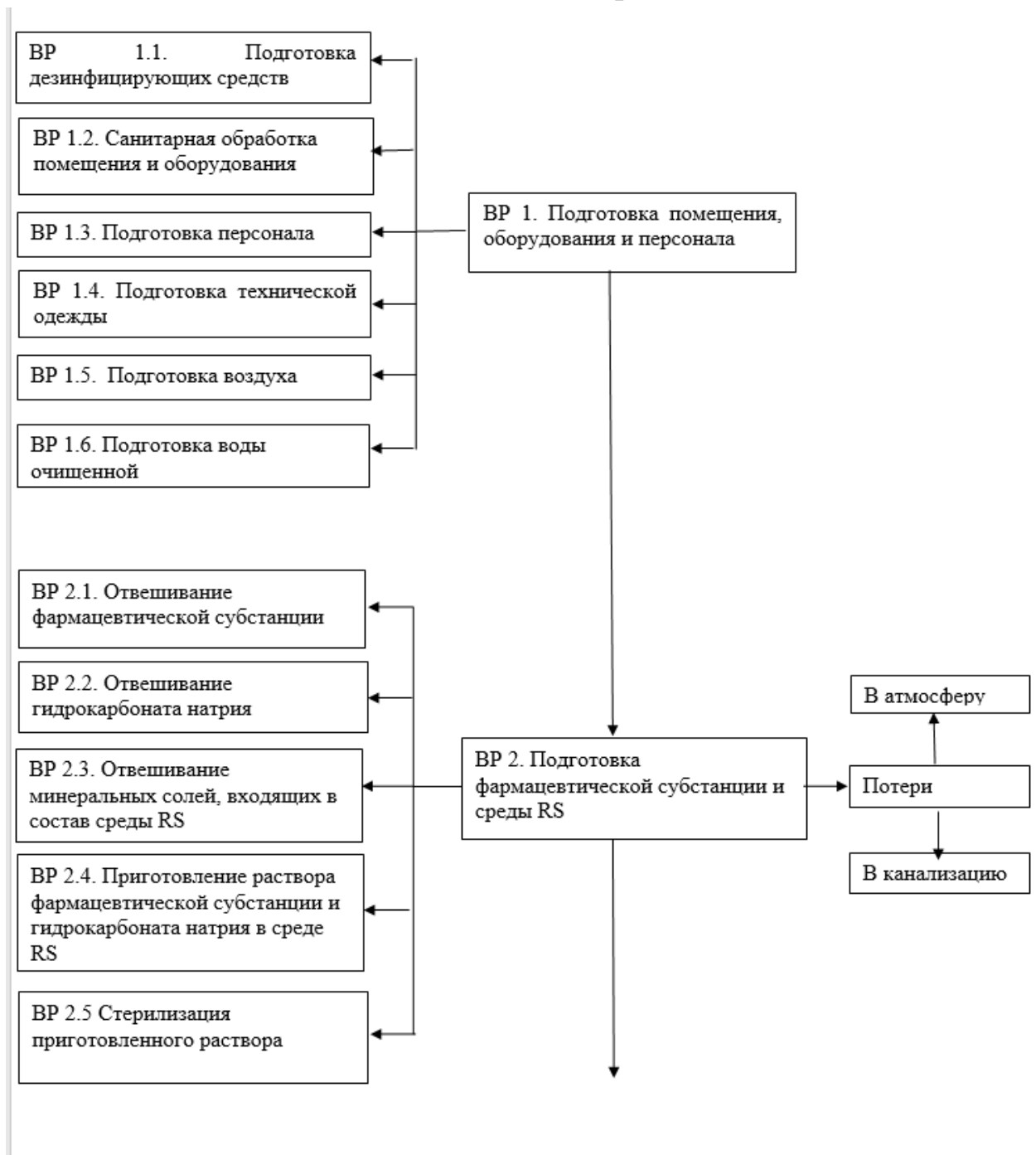
Раздел 2

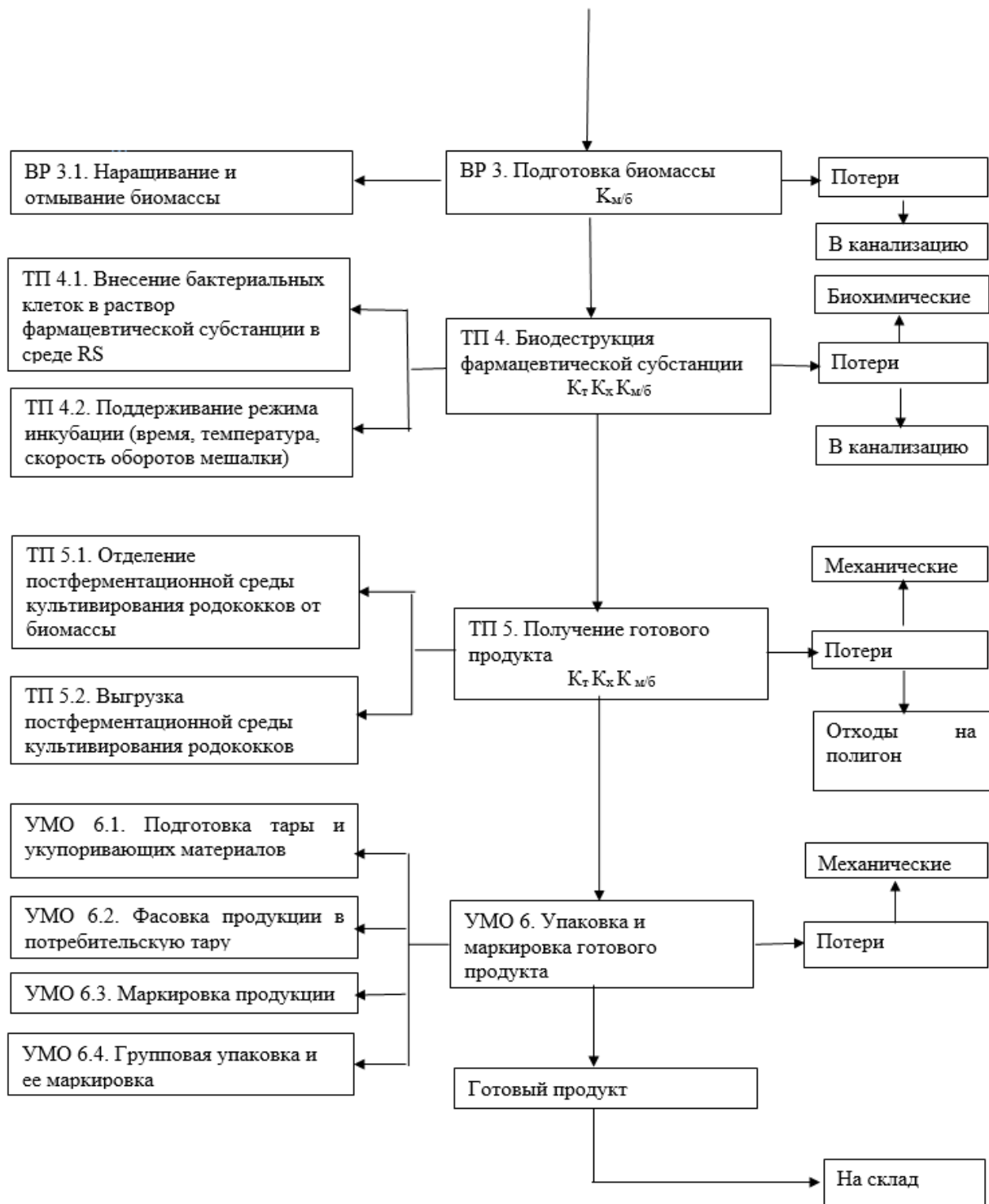
Химическая схема производства



Раздел 3

Технологическая схема производства



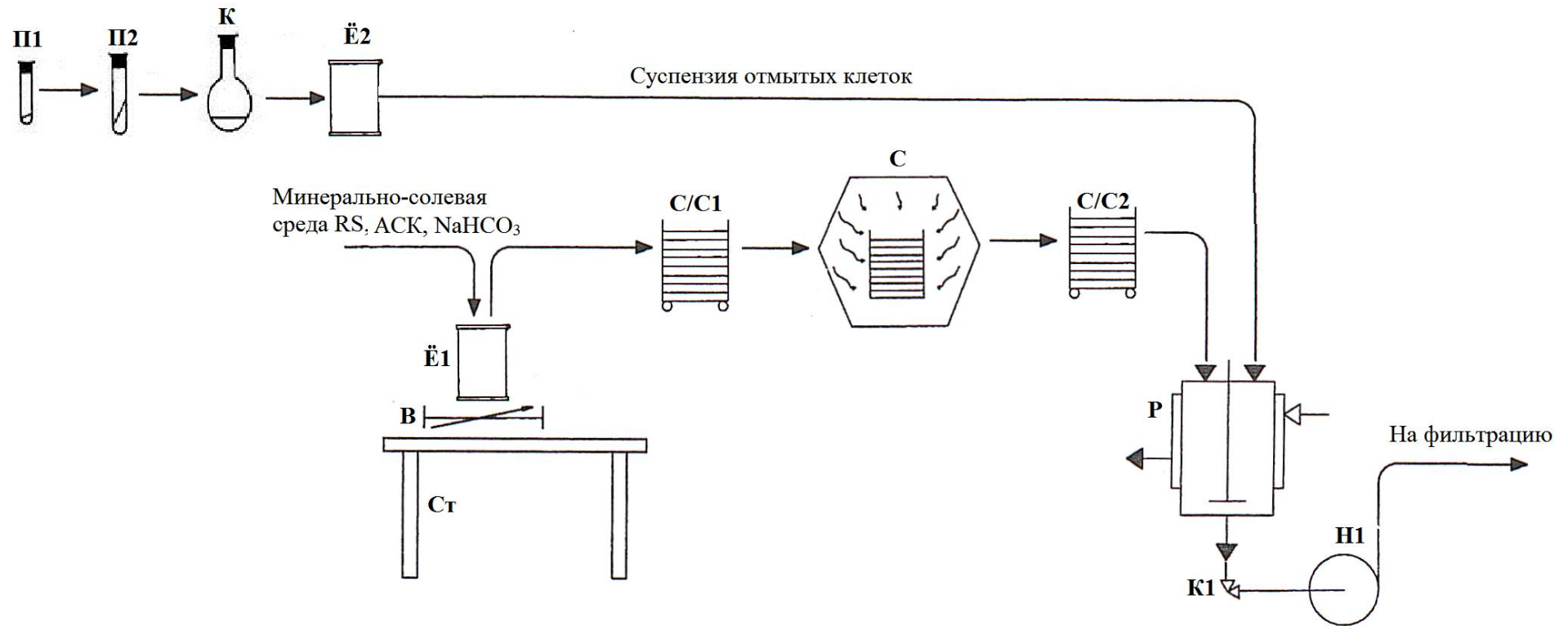


Нормы расхода сырья для получения 2-х литров постферментационной среды, содержащей фумаровую кислоту

Таблица 1

Техническое или торговое название сырья	Единица измерения	Квалификация	Расход на 2 л продукции
Ацетилсалициловая кислота	г	Порошок	5,0 г
Бактериальная культура	мл	Суспензия	$2,7 \times 10^7$ клеток/мл
KNO_3	г	ч.д.а.	2,0 г
KH_2PO_4	г	ч.д.а.	4,0 г
K_2HPO_4	г	ч.д.а.	4,0 г
NaCl	г	ч.д.а.	2,0 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	г	ч.д.а.	0,4 г
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	г	ч.д.а.	0,04 г
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	г	ч.д.а.	0,001 г
$(NH_4)_2 \cdot 6H_2O$	г	ч.д.а.	4,0 г
Вода	л	Очищенная	2 л
Натрия гидрокарбонат	г	ч.д.а.	4,6 г

Раздел 4
АППАРАТУРНАЯ СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА



П1 – пробирка с маточной культурой

П2 – пробирка с культурой на МПА

К – колба с культурой в МПБ

Ё1 – ёмкость для смешивания исходных веществ

Ё2 – ёмкость для центрифугирования и отмыwania бактериальных клеток

В – весы

Ст – стол

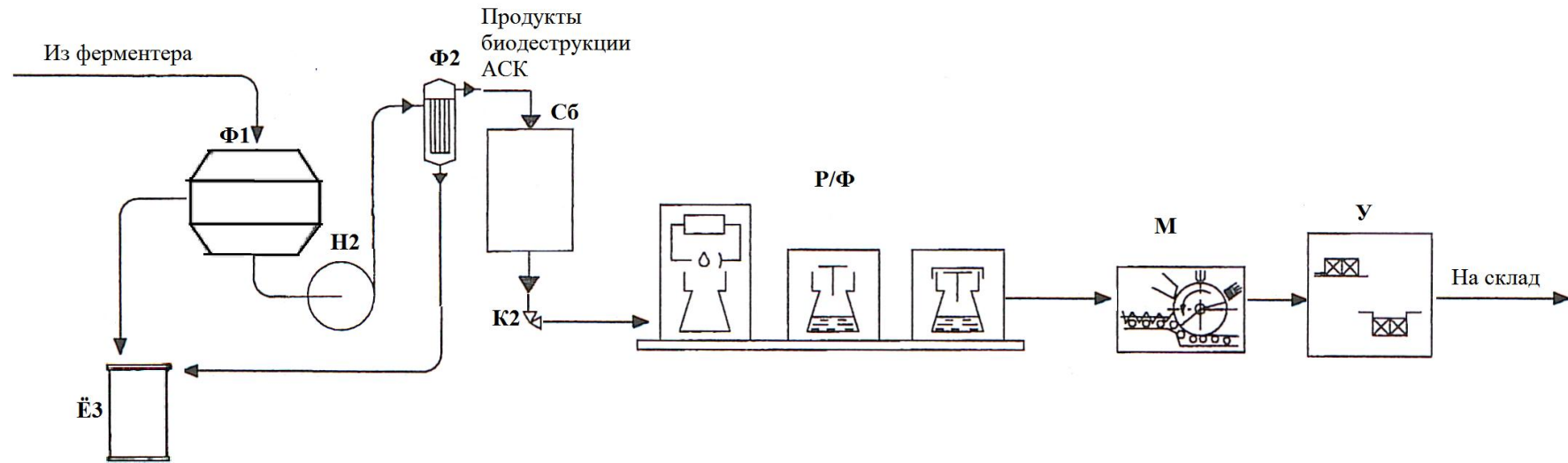
С/С1, С/С2 – стеллаж для стерилизатора

С – стерилизатор

Р – реактор ферментер

К1 – клапан запорный угловой

Н1 – насос лопастной центробежный



Ф1 – вакуум-барабанный фильтр

Ф2 – фильтр патронный под давлением выше атмосферного

Н2 – насос лопастной центробежный

ЁЗ – ёмкость для отходов биомассы

У – упаковка флаконов в коробку

К2 – клапан запорный угловой

М – маркировка флаконов

Р/Ф – розлив во флаконы, укупоривание пробкой и закручивание флаконов крышкой

Сб – сборник

Характеристики аппаратов и оборудования

Таблица 2

Наименование аппарата (оборудования) и обозначение на аппаратурной схеме	Число аппаратов (предметов оборудования)	Материал	Характеристика аппарата (оборудования)
1	2	3	4
Маточная культура <i>Rhodococcus jostii</i> ИЭГМ 60 в пробирке на МПА (П1)	1	Стекло	Емкость 20 мл
Трехсуточная культура <i>Rhodococcus jostii</i> ИЭГМ 60 в пробирке на МПА (П2)	1	Стекло	Емкость 20 мл
Пятисуточная культура в колбе с МПБ (К)	1	Стекло	500 мл
Ёмкость для смешивания исходных веществ (Ё1)	1	Стекло	4000 мл
Ёмкость для центрифугирования и отмывания клеток	1	Пластик	100 мл
Весы (В)	1	Пластик	Точность до 0,0001
Стол (Ст)	1	Металл	
Стеллаж для стерилизатора (С/С1, С/С2)	2	Металл	-
Стерилизатор (С)	1	Металл	-
Реактор - ферментер (Р)	1	Стекло	-
Кран запорный, угловой (К1, К2)	2	Металл	-
Насос лопастной центробежный (Н2, Н1)	2	Металл	-

1	2	3	4
Вакуум-барабанный фильтр (Ф1)	1	Металл	-
Фильтр патронный под давлением выше атмосферного (Ф2)	1	Металл	-
Сборник готового продукта (Сб)	1	Металл	-
Ёмкость для отходов биомассы (ЁЗ)	1	Пластик	-
Аппарат для розлива во флаконы, укупоривания пробкой и завинчивания флаконов крышкой (Р/Ф)	1	Металл	-
Аппарат для маркировки флаконов (М)	1	Металл	-
Упаковка флаконов в коробку (У)	1	Металл	-

Раздел 5

Характеристика сырья, микроорганизма, материалов и полученных продуктов

Таблица 3

Название сырья	Нормативный документ
1	2
Бактериальный штамм <i>Rhodococcus jostii</i> ИЭГМ 60	Коллекционная культура клеток из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, www.iegmc01.ru)
Ацетилсалициловая кислота	ГФ XIV, ч. 3, С. 3413-3416
Вода очищенная	ГФ XIV, ч. 3, С. 3602-3607
Калия нитрат	ГФ XIV, ч. 1, С. 1514

1	2
Калия фосфат однозамещённый	ГФ XIV, ч. 1, С. 1509
Калия фосфат двузамещённый	ГФ XIV, ч. 1, С. 1461
Натрия хлорид	ГФ XIV, ч. 1, С. 1602
Магния сульфат	ГФ XIV, ч. 1, С. 1550
Кальция хлорид безводный	ГФ XIV, ч. 1, С. 1523
Железа (III) хлорид	ГФ XIV, ч. 1, С. 1491
Аммония сульфат	ГФ XIV, ч. 1, С. 1401
Натрия гидрокарбонат	ГФ XIV, ч. 3, С. 4414-4416
Баллоны из стеклопластика	ОСТ 64-2-71-80
Крышки тип 1.1.	ТИП БВ-500-20-0С
Пробки полиэтиленовые с уплотнительными элементами типа 3.2.	ОСТ 64-2-87

Раздел 6

Изложение технологического процесса

Для получения продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты, содержащих фумаровую кислоту, используют реагенты в следующих количествах:

Ацетилсалициловая кислота	- 5,0 г
Минеральная среда RS	- 2 л
состава:	
(NH ₄) ₂ SO ₄	- 4,0 г
KNO ₃	- 2,0 г
KH ₂ PO ₄	- 4,0 г
K ₂ HPO ₄	- 4,0 г
NaCl	- 2,0 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	- 0,4 г
CaCl ₂	- 0,04 г
FeCl ₃ ·6H ₂ O	- 0,001 г
Вода очищенная	- 2 л
Натрия гидрокарбонат	- 4,6 г
Инокулят (взвесь бактериальной культуры <i>Rhodococcus jostii</i> ИЭГМ 60) в среде RS	- 0,5 мл

Процесс получения продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты, содержащих фумаровую кислоту, состоит из следующих стадий:

1. *Приготовление раствора ацетилсалициловой кислоты в среде RS.* Для изготовления 2 л раствора воду очищенную и порошкообразные компоненты отвешивают в емкость для смешивания, снабженную магнитной мешалкой.

2. *Стерилизация.* На стеллаже для стерилизации (С/С1) емкость с раствором ацетилсалициловой кислоты в среде RS перемещают в стерилизатор и стерилизуют при 2 атмосферах и 120⁰ С в течение 2 часов. Раствор охлаждают до 24-28°C и перемещают с помощью стеллажа (С/С2) в реактор - ферментер (Р).

3. *Подготовка инокулята.* Предварительно выращенную из маточной культуры (П1) в асептических условиях на твердых питательных средах (в пробирках) в течение трех суток бактериальную культуру *Rhodococcus jostii* ИЭГМ 60 (П2) помещают в колбу со стерильным мясопептонным бульоном (К).

4. *Центрифугирование.* По истечении пяти суток культуральную жидкость переливают в емкость для центрифугирования (Ё2) и центрифугируют при 1500-1600 об/мин в течение 7-10 мин. Отделенную от биомассы культуральную жидкость сливают в канализацию.

5. *Отмывание клеток.* В емкость для отмывания (Ё2) прибавляют 50 мл минерально-солевой среды RS, перемешивают и центрифугируют при 1600 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают в канализацию. Операцию повторяют дважды. К полученному осадку биомассы прибавляют 5 мл минерально-солевой среды RS и смешивают до получения взвеси.

6. *Биодеструкция ацетилсалициловой кислоты.* В реактор - ферментер (Р) из емкости для отмывания (Ё2) вносят отмывые клетки родококков до концентрации 1×10^7 клеток /мл. В реакторе - ферментере поддерживается постоянная температура 28°C и скорость вращения жидкости 160 об/мин в течение 15-ти сут.

7. *Отбор проб.* Пробы из реактора - ферментера отбирают на 5-е, 10-е и 15-е сут для химического анализа. Количественное определение ацетилсалициловой кислоты и фумаровой кислоты осуществляют в аналитической лаборатории.

8. *Центрифугирование.* Постферментационную среду родококков, содержащую конечные продукты биодеструкции ацетилсалициловой кислоты, насосом периодического действия (**Н1**) переносят в вакуум-барабанный фильтр (**Ф1**).

9. *Фильтрация.* Центрифугат постферментационной среды родококков, содержащий конечные продукты биодеструкции ацетилсалициловой кислоты, насосом периодического действия (**Н2**) пропускают через патронный фильтр (**Ф2**) в сборник готового продукта (**Сб**).

10. *Упаковка и маркировка.* Постферментационную среду родококков, содержащую конечные продукты биодеструкции ацетилсалициловой кислоты, разливают в стеклянные баллоны из темного стекла и укупоривают навинчивающейся крышкой (**Р/Ф**). На бирки баллонов наклеивают этикетки «Продукты биодеструкции ацетилсалициловой кислоты» (**М**). Промаркированные баллоны упаковывают в картонную коробку (**У**) и отправляют на склад.

**Длительность проведения технологических операций при получении
продуктов биодеструкции из 5,0 г ацетилсалициловой кислоты**

Таблица 4

Операция	Аппарат	Элемент работы	Время		
			Регла- мен- тируе- мое	Норми- руемое	Всего на опера- цию
1	2	3	4	5	6
Отвешивание материалов, приготовление среды RS и стерилизация	Емкость стеклянная 4 л	Отвешивание, загрузка, перемешивание и стерилизация	-	3 ч	3 ч
Подготовка инокулята	Пробирки, колбы	Посев и рост культуры, приготовление бактериальной суспензии	-	8 сут	8 сут

1	2	3	4	5	6
Биодеструкция ацетилсалициловой кислоты	Биореактор – ферментер	Получение продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты	-	-	10-15 сут
Центрифугирование	Центрифуга	Центрифугирование	-	0,5 ч	0,5 ч
Фильтрование	Вакуум-барабанный фильтр, фильтр под давлением выше атмосферного	Фильтрование	-	1 ч	1 ч
Упаковка и маркировка	Стекланный баллон	Упаковка и маркировка	-	-	1 ч
Итого:					18-23 сут

Раздел 7

Техника безопасности

Биодеструкцию ацетилсалициловой кислоты с использованием клеток *Rhodococcus jostii* ИЭГМ 60 проводят в асептических условиях при соблюдении инструкции по технике безопасности, охране труда и противопожарной безопасности.

Раздел 8

Переработка и обезвреживание отходов производства

Жидкие отходы биотехнологического производства сливают в сточные промышленные воды, при необходимости дополнительно обезвреживают дезинфицирующими средствами. В жидких отходах находятся остатки мясопептонного агара, мясопептонного бульона, остаточные количества минеральных солей (фосфатов) и микрофлора, которая не является патогенной. Плотные отходы биотехнологического производства (биомасса) размещают на санитарных полигонах или сжигают.

Раздел 9

Контроль производства и управление технологическим процессом

В процессе биодеструкции ацетилсалициловой кислоты исходное сырье и конечные продукты анализируют следующими методами:

Содержание ацетилсалициловой кислоты в постферментационной среде культивирования родококков – методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Идентификация продуктов биодеструкции (фумаровой кислоты) – методом ТСХ.

Содержание фумаровой кислоты в постферментационной среде культивирования родококков – методом ВЭЖХ-МС.

Концентрация клеток родококков – спектрофотометрическим методом.

Техническое описание модульного настольного ферментера BioFlo/CelliGen 115, Eppendorf

Таблица 5

1	2
Общий объем автоклавируемого сосуда из боросиликатного стекла с крышкой из нержавеющей стали	7500 мл
Рабочий объем сосуда в диапазоне	2000 - 5600 мл
Нагрев сосуда	С помощью термоманжеты
Охлаждение сосуда	с помощью погружного змеевика
Максимальная поддерживаемая температура	65°C
Перемешивание	двойная мешалка Раштона с механическим прямым приводом
Скорость перемешивания в диапазоне	50 - 1200 об/мин
Управления газовым потоком	автоматическое
Встроенный термический контроллер массового расхода газа в диапазоне	0,4 - 20 л/мин
Газовый смеситель	с 4 электромагнитными клапанами
Контроллер концентрации ионов водорода	с помощью рН-датчика
Контроль рН в диапазоне	2 - 14

1	2
Контроллер концентрации растворенного кислорода	с автоматической подачей воздуха по датчику
Дополнительный сосуд для стерильного внесения жидкостей в сосуд ферментера	1 л
Модуль с 3 перистальтическими насосами	
Перистальтические насосы с постоянной скоростью вращения	не менее 12 об/мин
Перистальтический насос с переменной скоростью вращения	не менее 200 об/мин
Требования к электропитанию	200/240 В, 50/60 Гц, 6 А, СЕ
USB-порты	2 шт.
Размеры сосуда с конденсатором выходящих газов в положении для автоклавирования (Ш x Г x В)	37 x 29 x 65 см
Размеры контрольной станции (Ш x Г x В)	40 x 41 x 70 см
Вес контрольной станции	28 кг
Управляющая ПЭВМ типа "Ноутбук" в количестве не менее	2 шт.
Процессор с тактовой частотой	2 ГГц
Оперативная память	4 Гб
Жесткий диск с характеристиками	Ёмкость 250 Гб, 7200 RPM, 3,0 Гб/сек., кэш 8 Мб

Раздел 10

Информационные материалы

Лабораторный регламент разработан в ПГФА согласно ОСТ 64-02-003-2002 на основании проведенных научных исследований и теоретических расчетов. На основании полученных данных выпущены следующие работы:

Определение салицилата натрия и продуктов его биодеструкции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / А.Н. Хренков, Е.В. Вихарева, Е.В. Тумилович [и др.] // Биофармацевтический Журнал. – 2019. – Т. 11. – № 1. – С. 31–35.

Хренков, А.Н. Идентификация гентиизиновой и фумаровой кислот в составе продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты/А.Н. Хренков, Е.В. Вихарева, З.В. Касьянов //Медико-фармацевтический журнал «Пульс». – 2020. – № 4.– С. 37–42.

РАЗРАБОТЧИКИ

Ассистент кафедры аналитической химии
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Пермская государственная
фармацевтическая академия» Министерства
здравоохранения Российской Федерации



А.Н. Хренков

Заведующий кафедрой аналитической химии
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Пермская государственная
фармацевтическая академия» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
доктор фармацевтических наук, профессор



Е.В. Вихарева

Приложение 2

**Протокол исследования острой токсичности
продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты**

ПРОТОКОЛ
исследования острой токсичности

Вид животных: мыши, самцы, массой 24-26 г.

Путь введения: перорально

Для исследования использовался метод определения средней летальной дозы Прозоровского В.В. (Фармакол. и токсикология. - 1978. - №4. - С. 497-502):

Острая токсичность определена в опытах на белых нелинейных мышах обоего пола массой 28-30 г, содержащихся на обычном рационе вивария. Исследуемое соединение вводили перорально в четырех дозах. Каждой паре животных вводили одну дозу в порядке возрастания. Всего в опыте использовано 8 мышей.

№	Соединение	ЛД ₅₀ , мг/кг
1	Продукт биодеструкции АСК	2580,0 (2100-3200)
2	АСК + NaHCO ₃	1460,0 (1100-2000)
3	RS-АСК	1410,0 (1200-1700)

Таким образом, исследованные вещества относятся к 3 классу соединений, т.е. являются умеренно токсичными (ГОСТ 12.1.007-76).

31.10. 2018 г.



Рудакова И.П.

Приложение 3
Документы по внедрению научных результатов исследований

« Утверждаю»

Ректор федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Пермская

государственная фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации

А.Ю. Турышев

30 января 2018 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научно-исследовательской работы

Наименование разработки: Методики идентификации ацетилсалициловой кислоты и продуктов её бактериальной деструкции в культуральных жидкостях родококков методом тонкослойной хроматографии.

Место разработки: Пермская государственная фармацевтическая академия, кафедра аналитической химии, 614990, Пермь, ул. Полевая, 2; perm@pfa.ru

Автор разработки: аспирант кафедры аналитической химии Пермской государственной фармацевтической академии Хренков Алексей Николаевич.

Место внедрения: Пермская государственная фармацевтическая академия, кафедра аналитической химии.

Форма и эффективность внедрения: Разработанные методики позволяют эффективно разделять и идентифицировать ацетилсалициловую кислоту и продукты её бактериальной деструкции в культуральных жидкостях родококков методом ТСХ и используются в лабораторном практикуме студентов ПГФА при изучении дисциплин «Аналитическая химия» и «Основы экологической химии».

Зав. кафедрой аналитической химии ФГБОУ ВО

ПГФА Минздрава России, д.ф.н., профессор

Е.В. Вихарева

Подпись
заверяю:

Вихарева Е.В.

(нач. отдела кадров) *Н.С. Григорьев*



Федеральное государственное
бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Пермская
государственная фармацевтическая
академия» Министерства
здравоохранения Российской Федерации
Пермский край, 614990, г. Пермь, ул.
Полевая, 2



«Утверждаю»
Ректор ФГБОУ ВО ПГФА
Минздрава России
А. Ю. Турьшев
« 22 » апреля 2019 г.

АКТ АПРОБАЦИИ

Предмет апробации: Методика количественного определения ацетилсалициловой кислоты в присутствии салициловой кислоты в биологическом объекте – постферментационных культуральных средах родокков.

Разработчики: аспирант кафедры аналитической химии Хренков А.Н., зав. кафедрой аналитической химии, профессор Вихарева Е.В., доцент кафедры токсикологической химии Тумилович Е.Ю.

Результат апробации: Методика количественного определения ацетилсалициловой кислоты в присутствии салициловой кислоты в биологическом объекте – постферментационных культуральных средах родокков является специфичной, соответствует критериям линейности и прецизионности.

Когда внедрено: Апрель 2019 г.

Заключение: Апробированная методика может быть использована для контроля остаточного содержания ацетилсалициловой кислоты в культуральных средах родокков, что имеет практическое значение при разработке инновационных технологий очистки сточных вод от фармполлютантов.

Руководитель РИЦ «Фарматест»,
зав. кафедрой токсикологической
химии ПГФА, д. фарм. н., профессор

Малкова Т.Л.

Федеральное государственное
бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Пермский государственный
национальный исследовательский
университет» 614990, г. Пермь,
ул. Букирева, 15



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
Пермского государственного национального
исследовательского университета,
С.О. Макаров
13 ноября 2019 г.

АКТ

внедрения в учебный процесс кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета результатов диссертационной работы Хренкова Алексея Николаевича на тему «Химический состав и фитостимулирующее действие продуктов бактериальной деструкции ацетилсалициловой кислоты», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Объект внедрения: Метаболические пути и условия биотрансформации ацетилсалициловой кислоты клетками *Rhodococcus jostii* ИЭГМ 60

Место использования: Кафедра микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета

Кем используется: Магистранты биологического факультета ПГНИУ, слушатели лекционного курса «Биоразнообразие и систематика микроорганизмов»

Когда внедрено: Ноябрь 2019 г.

Эффективность внедрения: Представленная информация о метаболических путях бактериальной трансформации ацетилсалициловой кислоты расширяет сведения о возможности использования актинобактериями рода *Rhodococcus* данного субстрата в качестве единственного источника углерода и энергии, а также способствует приобретению знаний, которые могут быть востребованы при переработке фармацевтических отходов биотехнологическим способом и реализации биотехнологических решений процессов доочистки сточных вод фармпредприятий от салицилатов.

И.о. декана биологического факультета
ПГНИУ, к.б.н., профессор

Н.Н. Паньков

Зав. кафедрой микробиологии
и иммунологии ПГНИУ, д.м.н., профессор,
академик РАН

В.А. Черешнев

Профессор кафедры
микробиологии и иммунологии ПГНИУ,
д.б.н.

М.С. Куюкина

Доцент кафедры
микробиологии и иммунологии ПГНИУ,
к.х.н.

С.П. Тендрякова

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР МЕДИКО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
УПРАВЛЕНИЯ РИСКАМИ ЗДОРОВЬЮ НАСЕЛЕНИЯ
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**

(ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»)

Монастырская ул., д. 82, Пермь, 614045; тел/факс: (342) 237 25 34, E-mail: root@fcrisk.ru,
http://www.fcrisk.ru, ОКПО 40899186, ОГРН 1025900507269, ИНН/КПП 5902291452/590201001

26.03.2020 № 59-50-16/08-379-2020

На № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФБУН «Федеральный
научный центр медико-
профилактических технологий
управления рисками здоровью
населения» профессор, д.м.н.



Алексеев В.Б.

АКТ АПРОБАЦИИ № 379

Предмет апробации: Методика определения содержания фумаровой кислоты как продукта биодеструкции ацетилсалициловой кислоты в биологических жидкостях (постферментационных средах родококков) методом ВЭЖХ/МС.

Разработчики: Коллектив авторов Пермской государственной фармацевтической академии: аспирант кафедры аналитической химии Хренков А.Н., зав. кафедрой аналитической химии, профессор Вихарева Е.В., доцент кафедры токсикологической химии Карпенко Ю.Н.

Результат апробации: Методика определения содержания фумаровой кислоты в постферментационных средах родококков является специфичной и пригодной для динамического определения концентрации фумаровой кислоты в процессе биодеструкции ацетилсалициловой кислоты.

Когда апробировано: Март 2020 г.

Заключение: Апробированная методика может быть использована для контроля содержания фумаровой кислоты в процессе биодеструкции ацетилсалициловой кислоты, что может иметь практическое значение при разработке инновационных технологий очистки сточных вод от фармполлютантов.

Председатель:

Заместитель заведующего отделом химико-Аналитических методов исследования, д.б.н., доцент

Нурисламова Т.В.

Члены комиссии:

Заведующий лабораторией методов жидкостной хроматографии, к.б.н.
Научный сотрудник лаборатории методов жидкостной хроматографии

Карнажицкая Т.Д.

Пермякова Т.С.

Подписи заверяю:

Начальник отдела кадров ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»



Тельфенбуйм Л.Н.