

УДК 543.544:615.216.5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОДЕИНА ФОСФАТА В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ РОДОКОККОВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А.Н. Плотников¹, Ю.Н. Карпенко¹, Е.В. Вихарева^{1*}, Е.А. Тюмина²,
М.И. Рычкова³, А.А. Селянинов⁴

(¹ Пермская государственная фармацевтическая академия, кафедры аналитической и токсикологической химии; ² Пермский государственный национальный исследовательский университет, кафедра микробиологии и иммунологии; ³ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, лаборатория алканотрофных микроорганизмов; ⁴ Пермский национальный исследовательский политехнический университет, кафедра теоретической механики и биомеханики; e-mail: vihareva@pfa.ru)

Разработаны условия количественного определения кодеина фосфата в среде культивирования родококков методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Процедура валидации подтвердила специфичность, линейность, прецизионность и правильность разработанной методики.

Ключевые слова: кодеина фосфат, биологическая деструкция, родококки, обращенно-фазная высокоэффективная жидкостная хроматография.

Кодеина фосфат [C₁₈H₂₄NO₇P, CAS:52-28-8,(5a,6a)7,8-didehydro-4,5-α-ероху-3-methoxy-17-methyl-morphinan-6-α-ol phosphate (1:1)] (КФ) представляет собой гетероциклическое азотсодержащее соединение, производное изохинолина (рис. 1). Это соединение, обладая анальгезирующим и противокашлевым действием, широко используется в составе многих комбинированных лекарственных средств [1]. Ежегодное мировое производство КФ имеет отчетливую тенденцию к возрастанию (свыше 380 т в 2011 г.). Увеличиваются также мировые показатели потребления КФ [2]. В организме человека кодеин подвергается O-деметилированию с образованием морфина и N-деметилированию с образованием норкодеина, которые экскретируются почками в виде глюкуронидов. Незначительная часть кодеина выделяется с мочой в свободном виде [3, 4]. Широкое использование КФ обусловило его попадание в окружающую среду. Так, кодеин обнаружен в грунтовых и поверхностных водах США, а также в поверхностных водах, почве и донных отложениях Испании (от 1,7 до 1000 нг/л) [5–7]. Присутствие фармполлютантов в окружающей среде даже на уровне нано- и микроколичеств крайне нежелательно, поскольку данные соединения, обладая выраженной биологической активностью, оказывают постоянное негативное воздействие на биоту [8–12]. Поэтому разработ-

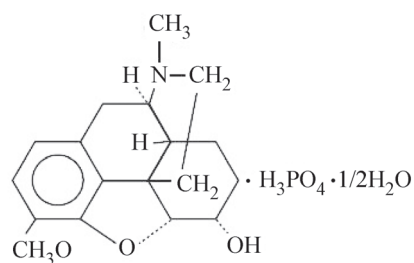


Рис. 1. Структурная формула кодеина фосфата

ка экологически безопасных и результативных способов разложения, детоксикации и выведения подобных микрополлютантов и продуктов их деструкции из экосистем представляет собой актуальную задачу. Все большее внимание при этом привлекают способы микробной деструкции. К наиболее активным биодеструкторам широкого ряда лекарственных средств относятся актинобактерии рода *Rhodococcus* [13–16]. Ранее нами показано, что родококки, активно доминирующие в почвенных микробиоценозах, способны к биодеструкции дротаверина гидрохлорида, лекарственного вещества миотропного действия, производного изохинолина [17, 18]. Полученные данные о каталитической активности родококков дают представление об их возможном вкладе в деконтаминацию природных экосистем от подобных загрязнителей и могут быть использованы при разработке технологии

высокоэффективного удаления фармполлютантов из сточных вод. В экспериментах по бактериальной деструкции КФ важно уточнить методические аспекты тестирования культуральной жидкости штаммов родококков на присутствие данного микроразрушителя. При этом следует отметить отсутствие работ, посвященных анализу КФ в постферментационной среде культивирования родококков. Поиск условий количественного определения КФ в данном случае предполагает разработку методики анализа, позволяющей оценить содержание КФ в образующейся многокомпонентной системе и степень его биодеструкции родококками.

В настоящей работе приведены результаты динамического определения содержания КФ в культуральной среде родококков методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Экспериментальная часть

Реактивы и материалы. В работе использовали кодеина фосфат в виде фармацевтической субстанции («LGC Standards», Польша), ацетонитрил (сорт 0) («Криохром», Россия), калия дигидрофосфат («х.ч.»), кислоту фосфорную концентрированную («х.ч.»). Деионизированную воду для приготовления подвижных фаз получали на установке «Simplicity UV» («Millipore», США).

Оборудование. Содержание КФ в культуральной среде родококков регистрировали методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе «Shimadzu LC Prominence», используя 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) 100А (4,6 мм × 250 мм) («Phenomenex»). Регистрацию и обработку хроматографической информации осуществляли с помощью программы LCsolution (version 1,25 rus).

Штамм-биодеструктор. В качестве биодеструктора КФ использовали штамм *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 647, изолированный из нефтесодержащей воды на территории нефтяного месторождения Пермского края и поддерживаемый в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекции культур WDCM 768, <http://www.iegmc.ru>). Родококки предварительно выращивали в течение трех суток на мясопептонном агаре («Oxoid», Великобритания), дважды

отмывали 10 мМ фосфатным буферным раствором (рН 7,0) и вносили в среду культивирования в концентрации $2,35 \cdot 10^{10}$ и $1,28 \cdot 10^{13}$ клеток/мл. На 8-е, 24-е и 38-е сутки процесса биодеструкции КФ применяли дополнительное внесение инокулята в фосфатный буферный раствор (рН 7,0).

Условия биодеструкции. Биодеструкцию КФ проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 100 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,0) и бактериальные клетки, в условиях периодического культивирования при 160 об/мин и 28 °С. КФ вносили в культуральную среду из стерильного концентрированного раствора (0,1%) до конечной концентрации 0,004%.

Подготовка проб культуральных жидкостей. Отбор проб культуральных жидкостей для хроматографического анализа проводили с периодичностью 5–10 сут. Для этого 2 мл культуральной жидкости, содержащей КФ и продукты его биодеструкции, родококки и продукты их жизнедеятельности, центрифугировали (1 000 об/мин; 3 мин; «MiniSpin», Германия). Надосадочную жидкость фильтровали через мембранный фильтр («AgilentTechnologies», США) с диаметром пор 0,2 мкм.

Подготовка стандартных образцов. В качестве контроля использовали фосфатный буферный раствор (рН 7,0), содержащий КФ в концентрации 0,004%, не инфицированный бактериальной культурой (абиотический контроль), а также фосфатный буферный раствор (рН 7,0), инокулированный клетками родококков и не содержащий КФ (раствор плацебо).

Условия хроматографического анализа. Разделение КФ и продуктов его биодеструкции проводили на колонке, упакованной обращенно-фазным сорбентом на основе силикагеля, модифицированного фазой С18 (размер частиц сорбента 5 мкм). В качестве подвижных фаз использовали водно-ацетонитрильные элюенты с добавлением модификаторов – фосфатных буферных растворов, имеющих значения рН, равные 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 и 7,0. Детектирование аналитов осуществляли с помощью диодно-матричного детектора при длине волны 210 нм (рис. 2).

Валидация биоаналитической методики. Валидацию биоаналитической методики проводили в соответствии с требованиями Center for Drug Evaluation and Research U.S. Food and Drug Administration (FDA, 2001) [19] и European Medicines Agency (EMA, 2009) [20] по следующим показателям: специфичность, линейность, прецизионность, правильность, предел обнаружения, количественное определение.

Результаты и их обсуждение

Выбор оптимальных условий количественного определения КФ в культуральной среде родококков методом обращенно-фазной ВЭЖХ осуществляли с учетом параметров, влияющих на хроматографическое разделение компонентов пробы (природа неподвижной фазы, рН подвижной фазы, содержание ацетонитрила в элюенте и режим элюирования).

КФ элюировали смесью ацетонитрил–вода и регистрировали в виде ассиметричных пиков во всех испытанных соотношениях компонентов подвижной фазы. Введение в состав элюента буферных растворов (перхлоратного или фосфатного) с разными значениями рН улучшает форму хроматографического пика анализируемого вещества. Наибольшую эффективность проявил элюент, состоящий из фосфатного буферного раствора (рН 3,0) и ацетонитрила в соотношении 85:15. Данный состав подвижной фазы обеспечивает четкое разделение пиков КФ, продуктов его деградации и других компонентов культуральной жидкости при использовании изократического режима элюирования. Выбор фосфатного буферного раствора в подвижной фазе обусловлен его использованием в качестве постферментационной среды культивирования родококков. Отказ от градиентного режима, наиболее часто применяемого при анализе многокомпонентных систем и предложенного нами ранее для определения содержания дротаверина гидрохлорида в культуральных жидкостях родококков [21], позволил существенно сократить время проведения анализа КФ.

Предложены следующие оптимальные условия хроматографического анализа КФ в культуральных жидкостях родококков: подвижная фаза, состоящая из фосфатного буферного раствора (рН 3,0) и ацетонитрила (15:85); поток элюента 1 мл/мин; температура колонки 40 °С; объем вводимой пробы 20 мкл. Длина волны детектирования 210 нм, что соответствует максимуму поглощения КФ (рис. 2). В данных условиях время удерживания КФ составило $4,90 \pm 0,05$ мин.

Специфичность. Оценку специфичности методики проводили посредством анализа раствора стандартного образца КФ (10 мкг/мл) в фосфатном буферном растворе (рН 7,0), раствора плацебо и культуральной жидкости родококков, содержащей КФ, после 26 сут процесса биодеструкции. Как видно из рис. 3, пики веществ, присутствующих в растворе плацебо, определяемого вещества и веществ, образующихся в процессе биодеструк-

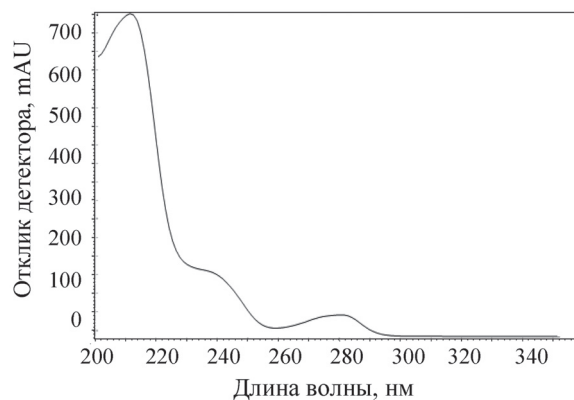


Рис. 2. УФ спектр КФ в подвижной фазе: ацетонитрил – фосфатный буферный раствор (рН 3,0)

ции КФ, четко разделены, что свидетельствует о специфичности методики анализа.

Линейность. Для определения линейности проводили анализ девяти модельных смесей на основе растворов плацебо с содержанием КФ в диапазоне от 0,5 до 50 мкг/мл. Зависимость площади хроматографического пика КФ от концентрации вещества описывается уравнением

$$S = 98222,5 \times c$$

где S – площадь пика, c – концентрация КФ, мкг/мл) с коэффициентом корреляции $r^2 = 0,9999$. Предел обнаружения КФ 0,2 мкг/мл, предел количественного определения 0,5 мкг/мл. Отклонения концентраций стандартных растворов КФ, использованных для построения градуировочного графика, от фактических значений (относительная погрешность, ϵ ,%) представлены в табл. 1. Полученные отклонения (не более 15%) соответствуют требованиям FDA (2001) и ЕМА (2009), предъявляемым к биоаналитическим методикам.

Прецизионность и правильность. Прецизионность и правильность методики количественного определения КФ устанавливали на четырех уровнях концентрации аналита в модельных смесях с содержанием КФ 0,5; 2; 10; 40 мкг/мл посредством расчета величин: среднего выборки \bar{X} , стандартного отклонения SD , относительного стандартного отклонения S_r (коэффициента вариации) и относительной погрешности ϵ (табл. 2). Полученные величины RSD и ϵ соответствуют нормам FDA и ЕМА.

Определение кодеина фосфата в культуральных жидкостях родококков. Разработанная методика количественного определения КФ была использована для оценки содержания КФ в культуральной жидкости родококков в процессе био-

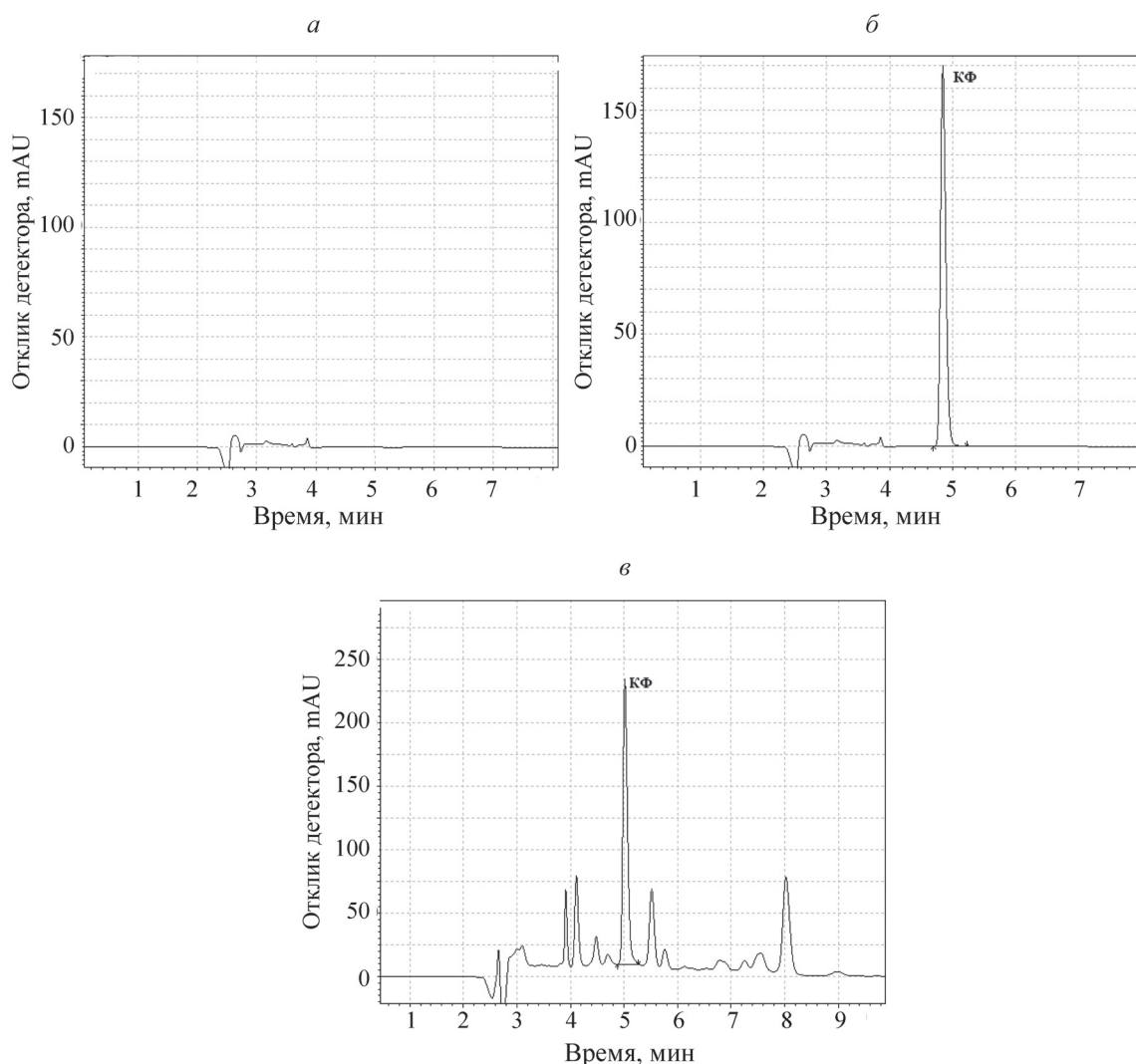


Рис. 3. Хроматограммы раствора плацебо (а); стандартного раствора КФ в фосфатном буферном растворе (б); культуральной жидкости родококков, содержащей КФ, после 26 сут ферментации (в)

Т а б л и ц а 1

Отклонения концентрации стандартных растворов КФ от фактических значений

$C_{\text{факт.}}^?$ МКГ/МЛ	0,50	2,00	4,00	6,00	10,00	20,00	30,00	40,00	50,00
$C_{\text{расч.}}^?$ МКГ/МЛ	0,53	1,92	4,15	6,09	9,84	19,22	30,71	40,52	50,88
$\varepsilon, \%$	6,00	-4,00	3,75	1,50	-1,60	-3,90	2,37	1,30	1,76

логической деструкции (табл. 3). Полученные данные свидетельствуют о том, что разработанная методика пригодна для исследования динамики процесса бактериальной деструкции КФ.

Таким образом, разработана методика количественного определения КФ в культуральной жидкости родококков методом обращенно-фазной ВЭЖХ, обеспечивающая точность результатов анализа с погрешностью измерения не более 15%. Процедура валидации показала, что раз-

работанная методика является специфичной, характеризуется выраженной правильностью и прецизионностью, что позволяет использовать ее для достоверной оценки КФ в процессе его биодеструкции. Относительная простота и экспрессность методики позволяют применять ее в лабораторных условиях при поиске новых штаммов-биодеструкторов, а также при разработке способов эффективного удаления КФ из сточных вод.

Т а б л и ц а 2

Прецизионность и правильность методики хроматографического определения КФ

Содержание КФ в модельной смеси (мкг/мл)	Измеренное содержание КФ в модельной смеси (мкг/мл)	\bar{X} , мкг/мл	SD, мкг/мл	S_r	ϵ , %
0,50	0,42; 0,45; 0,49; 0,48; 0,43; 0,51	0,44	0,03	0,07	-8,00
2,00	2,19; 2,01; 1,99; 2,07; 2,16; 2,09	2,09	0,08	0,04	4,50
10,00	9,89; 10,08; 9,97; 9,81; 10,11; 9,92	9,96	0,11	0,01	-0,40
40,00	41,24; 39,92; 39,77; 40,04; 38,98; 39,15	39,85	0,74	0,02	-0,38

Т а б л и ц а 3

Динамика изменения содержания КФ в процессе биологической деструкции при разной концентрации бактериальных клеток

Инокулят, клетки/мл	Время, сут									
	0	6	8	14	24	38	46	50	86	92
	концентрация КФ, %									
$2,35 \cdot 10^{10}$	100	85,40	83,48	72,54	70,48	67,69	42,61	5,97	1,00	0,08
$1,28 \cdot 10^{13}$	100	82,12	72,00	59,42	46,44	42,65	24,39	7,04	0,07	-

П р и м е ч а н и е: начальная концентрация КФ (0,004%) принята за 100%.

Исследование поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 17-44-590567) и программой поддержки биоресурсных коллекций ФАНО.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Регистр лекарственных средств России РЛС Энциклопедия лекарств // М., 2015. С. 426.
2. Narcotic drugs // United Nations publication. 2013. P. 382.
3. Srinivasan V., Wielbo D., Tebett I.R. // European Journal of Pain. 1977. Vol. 1. P. 185.
4. Vree T.V., van Dongen R.T., Koopman-Kinemani P.M. // International Journal of Clinical Practice. 2000. Vol. 54. P. 395.
5. Kolpin D.W., Furlong E.T., Thurman E.M., Barber L.B., Buxton H.T. // A National Reconnaissance. 2002. Vol. 36. N 6. P. 1209.
6. Fram M.S., Belitz K. // Science of the Total Environment. 2011. Vol. 409. P. 3410.
7. Vazquez-Roig P., Andreu V., Blasco C., Pico Y. // Science of The Total Environment. Vol. 440 N 1. P. 28.
8. Oaks J.L., Gilbert M., Virani M.Z., Watson R.T., Meteyer C.U., Rideout B.A., Shivaprasad H.L., Ahmed S., Chaudhry M.J.I., Arshad M., Mahmood M., Ali A., Khan A.A. // Nature. 2004. Vol. 427. P. 631.
9. Kidd K.A., Blanchfield P.J., Mills K.H., Palace V.P., Evans R.E., Lazorchak J.M., Flick R.W. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007. Vol. 104. P. 8899.
10. Triebkorn R., Casper H., Scheil V., Schwaiger J. // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2007. Vol. 387. N 4. P. 1410.
11. Micheli L., Reichel R., Werner W., Ghisi R., Thiele-Bruhn S. // Water, Air, and Soil Pollution. 2007. Vol. 223. N 8. P. 5243.
12. Brodin T., Fick J., Jonsson M., Klaminder J. // Science. 2013. Vol. 339. P. 814.
13. Yoshimoto T., Nagai F., Fujimoto J., Watanabe K., Mizukoshi H., Makino T., Kimura K., Saino H., Sawada H., Omura H. // Applied and Environmental Microbiology. 2004. Vol. 70. N 9. P. 5287.
14. Kim Y.-U., Han J., Lee S.S., Shimizu K., Tsutsumi Y., Kondo R. // Chemistry in Life Sciences. 2007. Vol. 340. P. 211.
15. Gauthier H., Yargeau V., Cooper D. // Science of the Total Environment. 2010. Vol. 408. P. 1704.
16. Larcher S., Yargeau V. // Environmental Pollution. 2013. Vol. 173. P. 19.
17. Ivshina I.B., Mukhutdinova A.N., Tyumina H.A., Suzina N.E., El'-Registan G.I., Mulyukin A.L. // Current Microbiology. 2015. Vol. 70. N 3. P. 311.
18. Ivshina I.B., Vikhareva E.V., Richkova M.I., Mukhutdinova A.N., Karpenko Ju.N. World // Journal of Microbiology and Biotechnology. 2012. Vol. 28. N 10. P. 2997.
19. 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. P. 10.
20. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: L., 2009. P. 14.
21. Karpenko Yu.N., Selyaninov A.A., Mukhutdinova A.N., Rychkova M.I., Baranova A.A., Vikhareva E.V., Ivshina I.B. // Journal of Analytical Chemistry. 2014. Vol. 69. N 7. P. 681.

CODEINE PHOSPHATE DETERMINATION IN LIQUID CULTURE MEDIUM OF *RHODOCOCCUS* BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

A.N. Plotnikov¹, Yu.N. Karpenko¹, E.V. Vihareva^{1*}, E.A. Tyumina²,
M.I. Richkova³, A.A. Selyaninov⁴

(¹Perm State Pharmaceutical Academy; ²Perm State National Research University; ³Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS; ⁴Perm National Research Polytechnic University; *e-mail: vihareva@pfa.ru)

Conditions for quantitative codeine phosphate determination in the medium for *Rhodococcus* cultivation using the reversed-phase high performance liquid chromatography were developed. The specificity, linearity, precision and accuracy of the method were confirmed by the validation procedure.

Key words: codeine phosphate, biological degradation, rhodococci, reversed-phase high.

Сведения об авторах: Плотников Александр Николаевич – аспирант кафедры аналитической химии Пермской государственной фармацевтической академии (lincoln_a.p@mail.ru); Карпенко Юлия Николаевна – доцент кафедры токсикологической химии Пермской государственной фармацевтической академии, канд. фарм. наук (karpenko_pfa@mail.ru); Вихарева Елена Владимировна – зав. кафедрой аналитической химии Пермской государственной фармацевтической академии, профессор, докт. фарм. наук (vihareva@pfa.ru); Тюмина Елена Александровна – аспирант кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета (elenatyumina@mail.ru); Рычкова Марина Ивановна – науч. сотр. лаборатории алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, канд. биол. наук (richkova@ieg.m.ru); Селянинов Александр Анатольевич – профессор кафедры теоретической механики и биомеханики Пермского национального исследовательского политехнического университета, докт. техн. наук (Prof.Selyaninov@yandex.ru).