

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГРАДИЕНТНОГО ВАРИАНТА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НО-ШПАЛГИН И ПРОДУКТОВ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕСТРУКЦИИ В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЯХ РОДОКОККОВ

Плотников А.Н.¹, Тумилович Е.Ю.¹, Вихарева Е.В.¹, Рычкова М.И.²

¹ ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, Пермь, Россия (614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2), e-mail: Lincoln_a.p@mail.ru;

² ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН, Пермь, Россия (614081, г. Пермь, ул. Голева, 13), e-mail: richkova@iegm.ru.

Установлены условия количественного определения компонентов комплексного лекарственного средства Но-шпалгин в присутствии продуктов их биологической деструкции в культуральных жидкостях родококков методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: элюент ацетонитрил – фосфатный буферный раствор (рН 3); градиентный режим элюирования; скорость потока элюента – 1 мл/мин; температура колонки – 40°C; объем вводимой пробы – 10 мкл; детектирование при длинах волн 220 нм и 240 нм. Показано, что на 30-е сутки процесса биодеструкции препарата Но-шпалгин содержание парацетамола в культуральной жидкости родококков составило 77,9%, дротаверина гидрохлорида – 21,2%, кодеина фосфата – 27,4%. Среди продуктов биодеструкции исследуемого лекарственного средства детектированы метаболиты парацетамола: *p*-аминофенол, гидрохинон, *p*-бензохинон, пирокатехин.

Ключевые слова: ВЭЖХ, Но-шпалгин, парацетамол, дротаверин, кодеин, биологическая деструкция, актинобактерии рода *Rhodococcus*

THE USAGE OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY GRADIENT VERSION FOR THE DETERMINATION OF THE COMPLEX MEDICINE NO-SPALGIN COMPONENTS AND THE PRODUCTS OF THEIR BIOLOGICAL DESTRUCTION IN CULTURE LIQUIDS OF RHODOCOCCLUS

Plotnikov A.N.¹, Tumilovich E.J.¹, Vikhareva E.V.¹, Richkova M.I.²

¹Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia (614990, Perm, 2 Polevaja Street), e-mail: Lincoln_a.p@mail.ru;

²Institute of Ecology and Genetics and Microorganisms, Russian Academy of Sciences (614081, Perm, 13 Golev Street, Russia), e-mail: richkova@iegm.ru.

The quantitative determination conditions of the complex medicine «NO-SPALGIN» components in the presence of their biological destruction products in culture liquids of *Rhodococcus* by HPLC method have been established: acetonitrile eluent - phosphate buffer solution (pH 3); gradient elution mode; eluent flow rate - 1 ml/min; column temperature - 40°C; injection sample volume – 10 μ l; detection at 220 nm and 240 nm. The paracetamol content in *Rhodococcus* culture liquids on the 30th day of the biological destruction of the medicine no-spalgin was shown to be 77,9 per cent, that of drotaverine hydrochloride - 21,2 per cent and that of codeine phosphate – 27,4 per cent. Paracetamol metabolites: *p*-aminophenol, hydroquinone, *p*-benzoquinone, catechol, have been detected among the biological destruction products of studied medicine.

Keywords: HPLC, No-spalgin, paracetamol, drotaverine, codeine, biological degradation, actinobacteria genus *Rhodococcus*

Но-шпалгин – комбинированное лекарственное средство (ЛС) анальгезирующего действия, содержащее парацетамол, дротаверина гидрохлорид (ДГ) и кодеина фосфат (КФ) [5]. В ранее проведенных нами исследованиях установлены оптимальные условия идентификации компонентов препарата Но-шпалгин, а также продуктов их биодеструкции в культуральных жидкостях родококков методом тонкослойной хроматографии [2]. Сведения о возможности количественного определения компонентов исследуемого препарата и продуктов их биодеструкции в культуральных жидкостях микроорганизмов методом

высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) отсутствуют.

Цель настоящего исследования

Разработать условия количественного определения компонентов препарата Но-шпалгин в присутствии продуктов их биодеструкции в культуральных жидкостях родококков методом ВЭЖХ.

Материалы и методы исследования

В работе использовали таблетки Но-шпалгин массой 0,65 г (ЗАО «Хиноин», Будапешт, Венгрия) состава: парацетамола 500 мг, дротаверина гидрохлорида 40 мг, кодеина фосфата (в форме гемигидрата) 8 мг и 10% вспомогательных веществ (кислота аскорбиновая, железа оксид желтый (E172), повидон, магния стеарат, кросповидон, тальк, крахмал кукурузный, карбоксиметилцеллюлоза).

Биодеструкцию исследуемого ЛС проводили в условиях периодического культивирования (160 об/мин, 28°C) в колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл минеральной среды RS [4], в течение 90 суток. Перед внесением в среду RS таблетки измельчали. Во избежание фотоинициированного окисления ДГ содержимое колб защищали от действия света с помощью светонепроницаемого материала. В качестве штаммов-биодеструкторов использовали *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 767 и *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 647 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекции культур 768) [7]. Ранее было показано, что штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 767 является наиболее эффективным катализатором процесса биодеструкции парацетамола [1], а штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 647 наиболее резистентен к дротаверину и кодеину [6, 9]. Бактериальные клетки используемых в работе штаммов вносили в минеральную среду RS, содержащую Но-шпалгин, в виде инокулята (10^7 клеток/мл). Поскольку при одновременном внесении данных штаммов происходит взаимное ингибирование их каталитической активности, а также адсорбция дротаверина на осадке образующихся продуктов разложения парацетамола, то процесс биодеструкции Но-шпалгина инициировали внесением клеток *R. rhodochrous* 647 с последующим добавлением (через 15 суток) клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 767.

Пробоподготовку культуральных жидкостей (2 мл), отобранных на 30-е сутки процесса биодеструкции Но-шпалгина, осуществляли посредством центрифугирования при 10000 об/мин в течение 5 мин («Mini Spin», Германия). Супернатант фильтровали через мембранный фильтр (Agilent Technologies, США) с диаметром пор 0,2 мкм.

В качестве контролей использовали (1) стерильный раствор Но-шпалгина в минеральной среде RS (абиотической контроль); (2) стерильный раствор Но-шпалгина в минеральной среде RS с инактивированными клетками родококков (для оценки степени

адсорбции компонентов на инактивированных бактериальных клетках (120°C, 20 мин); (3) минеральную среду RS с клетками родококков без ЛС (биотический контроль).

В качестве модельной смеси использовали метанольный раствор, содержащий парацетамол (5 мг/мл), КФ (0,08 мг/мл) и ДГ (0,4 мг/мл). В качестве свидетелей продуктов биодеструкции Но-шпалгина применяли растворы *n*-аминофенола, гидрохинона, бензохинона и пирокатехина (Merck, Германия) в абсолютном метиловом спирте с концентрацией 50 мкг/мл. Другие химические реагенты (х.ч., ч.д.а., о.с.ч.) были получены от отечественных фирм–производителей. Количественное определение содержания компонентов исследуемого ЛС в культуральных жидкостях родококков проводили методом абсолютной калибровки. Ввиду большой продолжительности лабораторных экспериментов полученные значения корректировали с учетом поправки на испарение воды с помощью уравнений, приведенных в работе Gauthier *et al.* [8].

Хроматографический анализ проводили с использованием хроматографа «Shimadzu LC Prominence» (Shimadzu, Япония), оборудованного колонкой из нержавеющей стали Luna 5u C 18 100A 250×4,6 мм, предколонкой Discovery® 2 см × 4,00 мм, в комплектации с насосом LC-20AD (рабочее давление до 20 Мпа), диодно-матричным детектором SPD-M20A, автодозатором SIL-20A/20AC и колоночным термостатом CTO-20A/20AC. Для управления системами хроматографа и получаемыми данными использовали программное обеспечение LC solution. Хроматографирование проводили в изократическом и градиентном режимах со скоростью потока элюента 1 мл/мин. В изократическом режиме в качестве подвижных фаз использовали ацетонитрил в смеси с бидистиллированной водой, а также фосфатными буферными растворами (рН 3 и рН 7) [3] в соотношениях, представленных в таблице 1.

Таблица 1

Подвижные фазы, использованные для хроматографирования компонентов модельной смеси в изократическом режиме элюирования

Ацетонитрил: фосфатный буферный раствор (рН 3), %	Ацетонитрил: фосфатный буферный раствор (рН 7), %	Ацетонитрил: вода, %
50 : 50	50 : 50	50 : 50
30 : 70	40 : 60	40 : 60
20 : 80	30 : 70	35 : 65

Результаты исследования и их обсуждение

Установлено, что в условиях изократического режима элюирования компонентов модельной смеси, содержащей парацетамол, КФ и ДГ, пики исследуемых веществ имели асимметричную форму. Кроме того, не наблюдалось полного разделения пиков

парацетамола и кодеина. Варьирование количества ацетонитрила в составе подвижной фазы также не позволило получить пики исследуемых веществ симметричной формы с пригодным для анализа временем удерживания. Поэтому для эффективного разделения компонентов модельной смеси применили градиентный режим элюирования. Установлено, что оптимальным является градиент с использованием подвижной фазы состава ацетонитрил – фосфатный буферный раствор (рН 3) при скорости потока элюента 1 мл/мин. Условия подачи подвижной фазы: с 0 до 7 мин – содержание ацетонитрила 10%, с 7 до 12,50 мин – увеличение концентрации ацетонитрила до 90%, к 13,50 мин – увеличение концентрации ацетонитрила до 95%, с 13,50 до 14,60 мин – изократический участок, с 14,61 мин – содержание ацетонитрила 10%.

Градиентный режим обеспечивает более полное и качественное разделение исследуемых веществ, чем изократический, а также сокращение времени их разделения до 20 мин, о чем свидетельствует хроматограмма модельной смеси, содержащей стандартные растворы парацетамола, ДГ и КФ в концентрациях, соответствующих их содержанию в препарате Но-шпалгин (рис. 1).

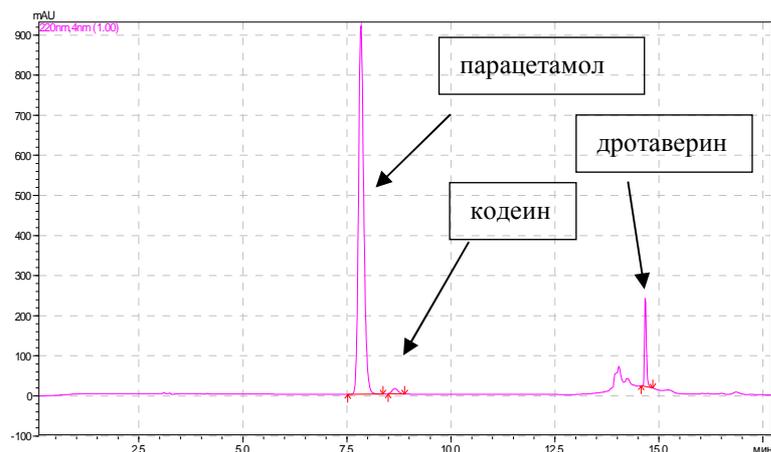
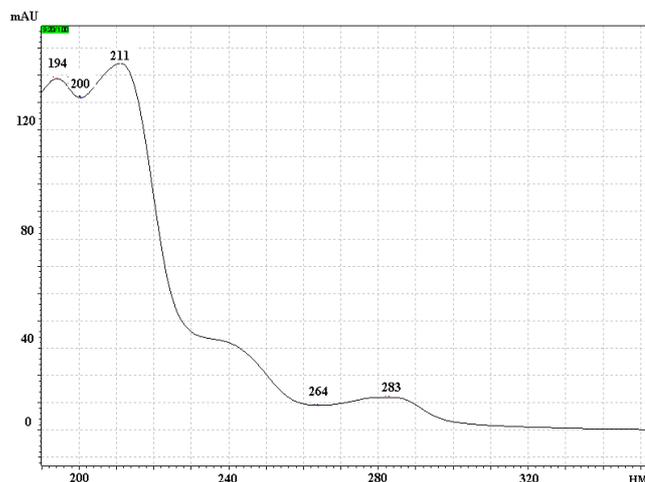
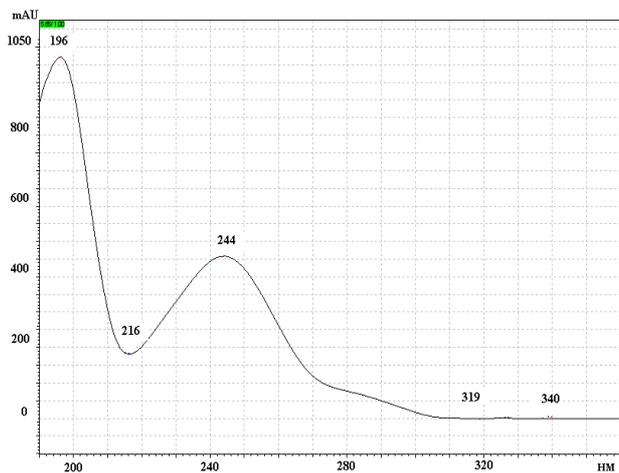


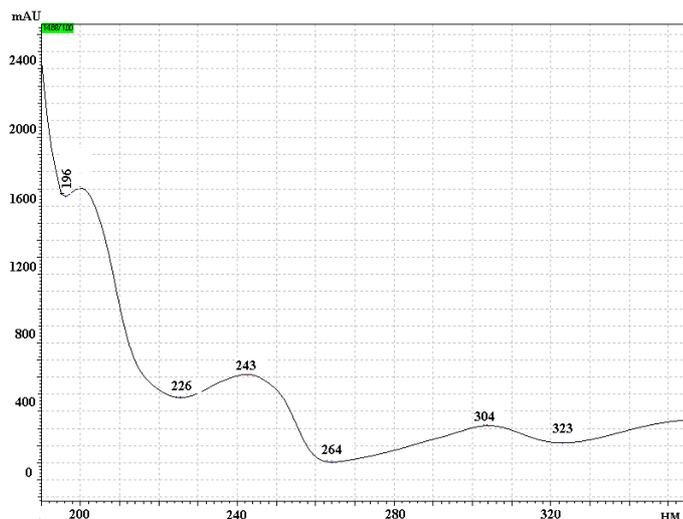
Рис. 1. Хроматограмма модельной смеси стандартных растворов парацетамола, дротаверина гидрохлорида и кодеина фосфата

УФ спектры парацетамола, КФ и ДГ имеют максимумы поглощения при длинах волн 244 нм, 211 нм и 243 нм соответственно (рис. 2).



А

Б



В

Рис. 2. УФ спектры парацетамола (А), кодеина фосфата (Б) и дротаверина гидрохлорида (В) в подвижной фазе: ацетонитрил – фосфатный буферный раствор (рН 3,0)

Следовательно, детектирование компонентов Но-шпалгина в культуральной жидкости родококков рационально проводить при длине волны 220 нм (кодеин) и 240 нм (парацетамол, дротаверин). Идентификацию продуктов биодеструкции (гидрохинона, пирокатехина, *n*-аминофенола) в соответствии с данными [4] также необходимо осуществлять при $\lambda=220$ нм, бензохинона – при $\lambda=240$ нм.

Таким образом, установлены следующие условия количественного определения ингредиентов препарата Но-шпалгин и детектирования их метаболитов методом ВЭЖХ в постферментационной среде культивирования родококков: состав элюента – ацетонитрил-фосфатный буферный раствор (рН 3); градиентный режим элюирования; скорость потока элюента – 1 мл/мин; температура колонки – 40°C; объем вводимой пробы – 10 мкл; детектирование при длинах волн 220 нм и 240 нм. Результаты количественного определения компонентов препарата Но-шпалгин и детектирования продуктов их разложения в образцах культуральной жидкости родококков, отобранных на 30-е сутки процесса биодеструкции, с использованием градиентного варианта ВЭЖХ представлены на рисунке 3.

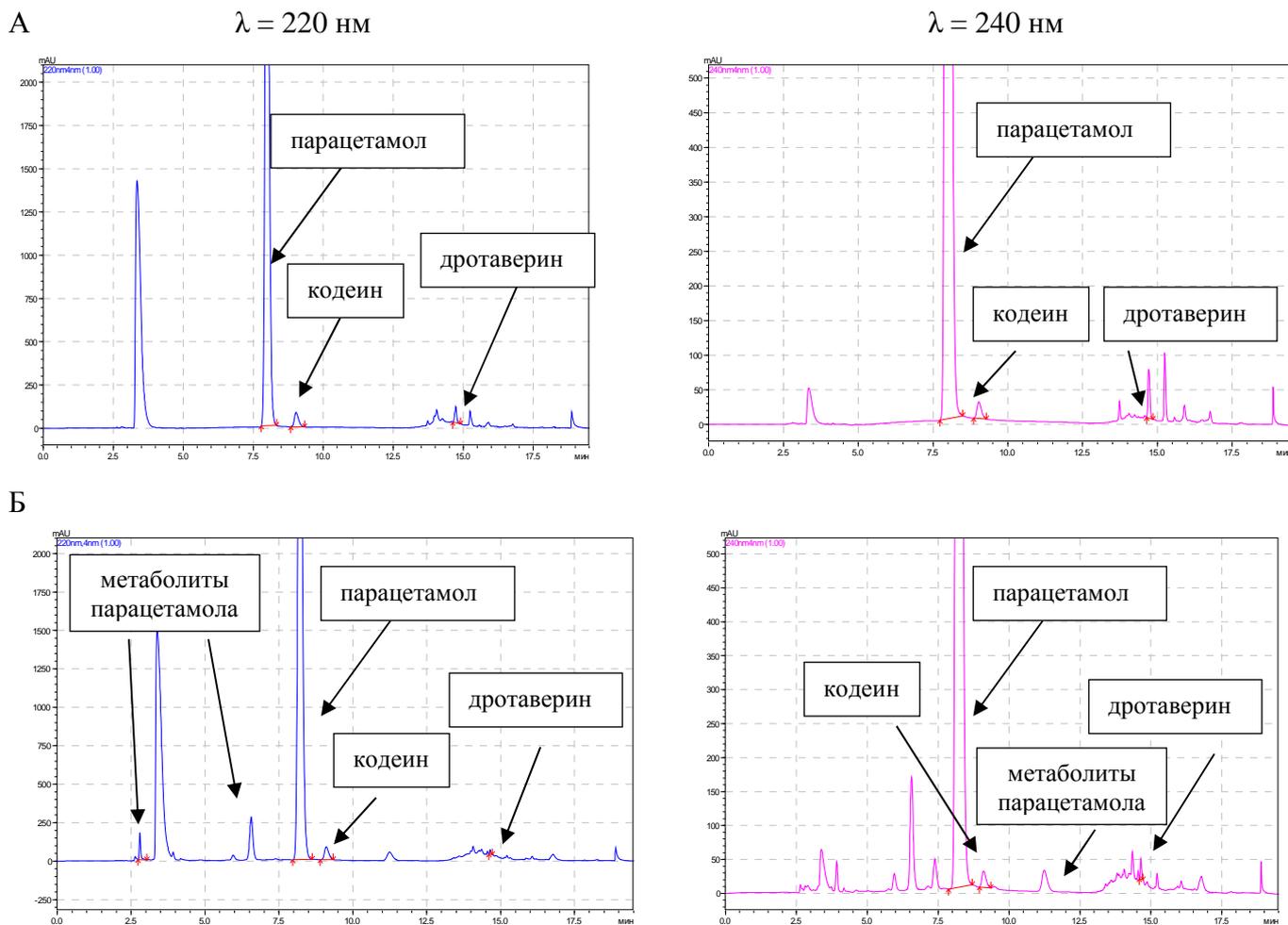


Рис. 3. Хроматограммы компонентов препарата Но-шпалгин и их метаболитов в культуральной жидкости родококков через 30 суток процесса биодеструкции.
 А — абиотический контроль; Б — культуральная жидкость родококков

В таблице 2 представлены параметры идентификации компонентов препарата Но-шпалгин и продуктов их биодеструкции с использованием градиентного варианта ВЭЖХ.

Таблица 2

Параметры идентификации компонентов препарата Но-шпалгин и продуктов их биодеструкции в культуральных жидкостях родококков

Название веществ	Параметры идентификации	
	Время удерживания, МИН	Длина волны, НМ
Парацетамол	8,2	240
Кодеин	9,0	220
Дротаверин	14,6	240
<i>Продукты биодеструкции парацетамола</i>		
<i>n</i> -Аминофенол	2,8	220
Гидрохинон	6,3	220

<i>n</i> -Бензохинон	11,3	240
Пирокатехин	13,7	220

По нашим данным, на 30-е сутки процесса биодеструкции таблетированного ЛС Но-шпалгин содержание парацетамола в культуральной жидкости родококков составило 77,9%, дротаверина гидрохлорида – 21,2%, кодеина фосфата – 27,4%. В абиотическом контроле и контроле сорбции не наблюдалось снижения концентрации исследуемых веществ. Среди продуктов биодеструкции Но-шпалгина ввиду наибольшего содержания в препарате парацетамола в культуральной жидкости были детектированы в основном метаболиты данного вещества: *n*-аминофенол, гидрохинон, *n*-бензохинон и пирокатехин. Низкая степень деградации парацетамола, возможно, связана с тем, что в культуральной среде появляются продукты деградации кодеина, которые снижают каталитическую активность *R. erythropolis* ИЭГМ 767.

Заключение

Разработана методика количественного определения ингредиентов комплексного лекарственного средства Но-шпалгин в присутствии продуктов их биологической деструкции в культуральных жидкостях родококков с использованием градиентного варианта ВЭЖХ.

Список литературы

1. Вихарева Е.В., Мишенина И.И., Ившина И.Б., Рычкова М.И. Влияние вспомогательных веществ, входящих в состав таблеток парацетамола, на процесс его биодеструкции. Вопросы медицинской, биологической и фармацевтической химии. – 2008. – № 3. – С. 25–28.
2. Вихарева Е.В., Плотников А.Н., Мухутдинова А.Н., Мишенина И.И., Пospelова А.А., Тумилович Е.Ю. Идентификация компонентов комплексного лекарственного средства Но-шпалгин и продуктов их биодеструкции в культуральных жидкостях родококков. Фундаментальные исследования. – 2014. – № 9 (часть 5). – С. 1032–1037.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации XII: официальное издание. Ч. 1. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения. – 2008. – С. 445.
4. Мишенина И. И. Разработка биотехнологического способа утилизации непригодных к медицинскому использованию лекарственных средств, производных фенола: дис. канд. фармацевт. наук. – Пермь, 2008. – 156 с.
5. Регистр лекарственных средств России [Электронный ресурс]: официальный сайт. – Электрон. дан. – Режим доступа: <http://www.rlsnet.ru/> (дата обращения: 25.07.2014);

6. Тюмина Е.А., Зязева В.А., Тумилович Е.Ю., Рычкова М.И., Вихарева Е.В. Интенсификация процесса биодеструкции кодеина фосфата // Современные тенденции и перспективы развития фармацевтического образования и науки в России и за рубежом: материалы науч.-практ. конф. с международным участием (Пермь, 21–23 ноября 2013 г.). – Пермь, 2013. – С. 156–158.
7. Catalogue of Strains of Regional Specialized Collection of Alcanotrophic Microorganisms. [Электронный ресурс] URL: [http:// www.iegm.ru/iegmcol/strains](http://www.iegm.ru/iegmcol/strains) (дата обращения 15.07.2015).
8. 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. – V. 408. – P. 1701–1706.
9. Ivshina I. B. Biodegradation of drotaverine hydrochloride by free and immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 608/Ivshina I. B., Vikhareva E. V., Richkova M. I., Mukhutdinova A. N., Karpenko Ju. N.// World J. Microbiol. Biotechnol. – 2012. V. 28. – P. 2997–3006.

Рецензенты:

Малкова Т.Л., д.фарм.н., зав. кафедрой токсикологической химии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь;

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