

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОДУКТОВ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕСТРУКЦИИ КОДЕИНА ФОСФАТА МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ – МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Плотников А.Н.<sup>1</sup>, Тюмина Е.А.<sup>2</sup>, Катаев С.С.<sup>3</sup>, Вихарева Е.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, Пермь, Россия (614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2), e-mail: vihareva@pfa.ru;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия (614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15), e-mail: elenatyumina@mail.ru;

<sup>3</sup>ГКУЗОТ «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы», Пермь, Россия (614077, г. Пермь, ул. Старцева, 61), e-mail: forenschemist@yandex.ru.

Разработаны условия идентификации кодеина фосфата и продуктов его биологической деструкции в культуральной жидкости *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 647 методом газовой хроматографии–масс-спектрометрии с использованием твердофазной экстракции. Результаты анализа исследуемых соединений в виде ацетильных дериватов и нативных веществ показали, что основными продуктами биодеструкции кодеина фосфата клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 647 являются кодеинон, гидрокодон и 14-гидрокси Кодеинон. Показано, что относительно содержание кодеина и его метаболитов в культуральной жидкости родококков целесообразно оценивать без проведения процедуры дериватизации. Представлена схема биотрансформации кодеина фосфата клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 647. Использование данного штамма-биодеструктора может быть перспективно для получения 14-гидрокси Кодеинона, являющегося важным промежуточным продуктом в синтезе наркотических анальгетиков и их антагонистов.

Ключевые слова: кодеин, кодеинон, гидрокодон, 14-гидрокси Кодеинон, биологическая деструкция, актинобактерии рода *Rhodococcus*, газовая хроматография – масс-спектрометрия.

## IDENTIFICATION OF CODEINE PHOSPHATE BIODEGRADATION PRODUCTS BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

Plotnikov A.N.<sup>1</sup>, Tyumina E.A.<sup>2</sup>, Kataev S.S.<sup>3</sup>, Vikhareva E. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia (614990, Perm, 2 Polevaja Street), e-mail: vihareva@pfa.ru;

<sup>2</sup>Perm State National Research University, Perm, Russia (614990, Perm, 15 Bukireva Street), e-mail: elenatyumina@mail.ru;

<sup>3</sup>Perm Regional Bureau of Forensic Medical Examination, Perm, Russia (614077, Perm, 61 Startseva Street), e-mail: forenschemist@yandex.ru.

Conditions for identification of codeine phosphate and its biodegradation products in culture media of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 647 by gas chromatography-mass spectrometry using solid-phase extraction were developed. Analyses of compounds in the form of acetyl derivatives and native materials have shown that major biodegradation products of codeine phosphate by cells of *R. rhodochrous* IEGM 647 are codeinone, hydrocodone and 14-hydroxycodeinone. It is shown that the relative contents of codeine and its metabolites in *Rhodococcus* culture media should be estimated without the derivatization procedure. A scheme of the codeine phosphate biotransformation by *R. rhodochrous* IEGM 647 has been described. The use of this biodegrading strain can be useful to produce 14-hydroxycodeinone, an important intermediate in the synthesis of narcotic analgesics and antagonists.

Keywords: codeine, codeinone, hydrocodone, 14-hydroxycodeinone, biological degradation, genus *Rhodococcus* actinobacteria, gas chromatography-mass spectrometry.

В настоящее время остро стоит проблема загрязнения окружающей среды фармполлютантами – лекарственными средствами и их метаболитами [1]. Они обнаруживаются в природных водных источниках, сточных водах и даже питьевой воде. Среди фармацевтических соединений, детектируемых в окружающей среде, большое число представлено азотсодержащими гетероциклическими соединениями, в том числе

изохинолинового ряда [5]. Одним из наиболее широко представленных фармполлютантов является кодеин ( $C_{18}H_{21}NO_3$ , CAS: 76-57-3, 5- $\alpha$ , 6- $\alpha$ -7,8-дидегидро-4,5-эпокси-3-метокси-17-метилморфинан-6-ол) – лекарственное средство анальгезирующего и противокашлевого действия [2].

В процессах естественного самоочищения открытых экосистем доминирующую роль играют актинобактерии рода *Rhodococcus*. Выраженная экологическая пластичность, полифункциональность, способность к усвоению различных ксенобиотиков указывают на технологические преимущества использования родококков в качестве потенциальных биокатализаторов процессов деструкции различных ксенобиотиков, в том числе и фармполлютантов [7]. Ранее нами на примере дротаверина гидрохлорида было показано, что родококки способны к биодеструкции лекарственных средств, производных изохинолина с образованием простых ароматических соединений – производных протокатеховой кислоты [6]. На настоящий момент имеются сведения о биотрансформации кодеина с использованием некоторых групп микроорганизмов. Так, в работах Lister *et al.* идентифицированы продукты биотрансформации кодеина штаммом *Pseudomonas putida* m10: дигидрокодеин, гидрокодон и 14-гидроксикодеин [8]. В экспериментах по биотрансформации кодеина цианобактериями *Nostoc muscorum* обнаружены 6-ацетилкодеин, оксикодон, норкодеин и морфин [9]. Информация по биодеградации кодеина актинобактериями рода *Rhodococcus* отсутствует.

**Цель настоящего исследования:** идентифицировать продукты биологической деструкции кодеина фосфата в культуральных жидкостях родококков методом газовой хроматографии–масс-спектрометрии.

#### **Материалы и методы исследования**

В работе использовали кодеина фосфат (КФ) в виде фармацевтической субстанции (белый кристаллический порошок производства Алкалоида Химический завод ЗАО, Венгрия). Биодеструкцию КФ проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 100 мл фосфатного буферного раствора состава (г/л):  $Na_2HPO_4$ -8,9;  $KH_2PO_4$ -3,39 (рН 7,0) в условиях периодического культивирования на орбитальной качалке Cetromat IS (“Sartorius”, Германия) при 160 об/мин и температуре 28°C. В качестве штамма-биодеструктора использовали *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 647, поддерживаемый в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекции культур 768, [www.iegm.ru/iegmcol](http://www.iegm.ru/iegmcol)) [4]. КФ вносили в среду культивирования из стерильного концентрированного раствора (0,1%) до конечной концентрации 0,004% на 3 сут процесса биодеструкции. Продолжительность процесса биодеструкции КФ составляла 27 сут. Для

анализа использовали пробы, отобранные на 26 сут процесса биодеструкции с остаточным содержанием кодеина фосфата 1,2 %.

Для извлечения кодеина совместно с продуктами биодеструкции из культуральной жидкости родококков использовали метод твердофазной экстракции. Продукты биодеструкции КФ исследовали методом ГХ-МС в виде нативных веществ и ацетильных дериватов, учитывая наличие в структуре КФ полярных гидроксильных групп и снижение его концентрации в процессе биологической деструкции.

*Оборудование.* Исследование состава продуктов биодеструкции КФ проводили с использованием газового хроматографа Agilent 7820, оснащенного капиллярной кварцевой колонкой HP-5MS длиной 30 м с внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм, и масс-селективного детектора Agilent 5975 (Agilent, США). Для твердофазной экстракции применяли систему с вакуумной камерой (манифолд) на 12 позиций (Supelico) и насос низкого вакуума AIR CADET (США). Для выполнения процедур дериватизации использовали термоблок ПЭ-4030 (ОАО «Экрос», Россия), одноканальный испаритель ПЭ-2300, микровстряхиватель ПЭ-2 (ОАО Экрос, Россия), полуавтоматические пипетки-дозаторы, позволяющие отбирать объемы жидкостей 4-40 мкл, 40-200 мкл и 0.2-1 мл, 1-5 мл. В качестве источника микроволнового излучения применяли СВЧ – печь Rolsen MS1770SA (Россия).

*Режим работы газового хроматографа с масс-селективным детектором.* Скорость потока газа-носителя (гелий) через колонку составляла 1,5 мл/мин, режим работы split/splitless (деление потока 15:1, с задержкой включения 1 мин после ввода пробы). Температура испарителя, хроматографа и интерфейса детектора задавалась в значениях 250 и 280 °С. Температура колонки начальная 70 °С в течение 2 мин, прогрев до 280 °С со скоростью программирования 20 град/мин, выдержка при конечной температуре 8 мин. Напряжение на умножителе масс-селективного детектора устанавливали равной величине автоматической настройки детектора. Регистрацию масс-спектров для ацетильных производных кодеина и продуктов его биодеструкции проводили в режиме полного сканирования ионов в интервале масс 42-450 а.е.

*Пробоподготовка культуральных жидкостей родококков.* Подготовку проб культуральных жидкостей родококков для твердофазной экстракции осуществляли посредством их центрифугирования в течение 5 мин при 10000 об/мин. (MiniSpin Eppendorf, Германия). Полученные образцы в количестве 30 мл экстрагировали трехкратно равными (по 10 мл) объемами хлороформа при рН 10. Необходимое значение рН среды устанавливали с помощью универсального индикатора путем добавления концентрированного раствора аммиака. Объединенные экстракты сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель удаляли на роторном

испарителе. Сухой остаток после испарения экстрагента растворяли в 1 мл метанола. В качестве контролей использовали: стерильный раствор КФ 0,004% в фосфатном буферном растворе (рН 7,0) – абиотический контроль, а также надосадочную жидкость от живых клеток *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 647 в фосфатном буферном растворе (рН 7,0), не содержащем КФ – раствор плацебо.

К исследуемым пробам объемом 0,5 мл прибавляли 50 мкл спиртового раствора внутреннего стандарта – этилморфина гидрохлорида (0,02 мг/мл) и 2 мл 1/15 М фосфатного буферного раствора (рН 4,8). Содержимое флаконов центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Центрифугат отделяли от осадка и подвергали твердофазной экстракции.

*Процедура твердофазной экстракции.* Экстракцию проводили на патронах *SampliQ EVIDEX* (200 мг/3 мл), имеющих смешанный тип фазы (обращенная и катионит). Кондиционирование сорбента проводили путем последовательного пропускания через картридж 2 мл 95% этанола и 2 мл 1/15 М фосфатного буферного раствора (рН 4,8), после чего загружали образец со скоростью 1 мл/мин. Промывку сорбента осуществляли последовательно 1 мл 1/15 М фосфатного буферного раствора (рН 4,8) и 1 мл 10% этанола со скоростью 2-3 мл/мин. Сушку патрона проводили под вакуумом в течение 20 минут. Элюирование проводили двукратно по 2 мл смеси н-гексан–этилацетат (3:1) (элюат I, элюат не исследовали). Далее элюировали двукратно по 2 мл смеси дихлорметан–*изо*-пропанол–25% раствор аммиака (4:1:0,1). Элюат II испаряли в токе азота при температуре 40<sup>0</sup> С.

*Дериватизация.* К сухому остатку элюата II прибавляли 40 мкл безводного пиридина и 60 мкл уксусного ангидрида, флакон плотно закупоривали и обрабатывали микроволновым излучением в СВЧ – печи с мощностью 560 Вт в течение 5 минут. После охлаждения флакон вскрывали и выпаривали избыток реагентов в токе азота при температуре не выше 40<sup>0</sup> С. Сухой остаток растворяли в 100 мкл безводного этилацетата и 1 мкл вводили в инжектор хроматографа.

Все использованные в работе растворители и реактивы имели квалификацию «х.ч.».

## Результаты исследования и их обсуждение

В культуральных жидкостях *R. rhodochrous* ИЭГМ 647 в виде ацетилderivатов были разделены и идентифицированы 6-О-ацетилкодеин, гидрокодон, кодеинон и 14-ацетоксикодеинон. Хроматограммы пробы культуральной жидкости родококков, абиотического контроля и раствора плацебо представлены на рис. 1-3.

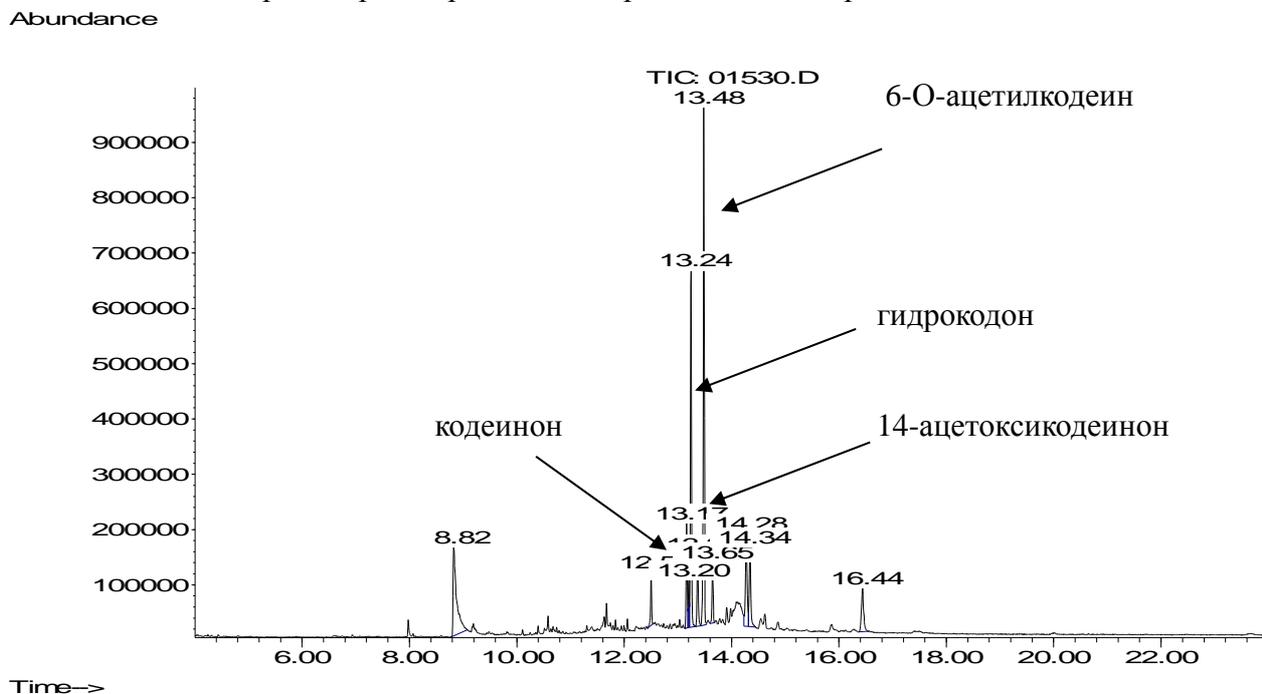


Рис. 1. Хроматограмма экстракта культуральной жидкости родококков, содержащего КФ и продукты его биодеструкции в виде ацетилderivатов

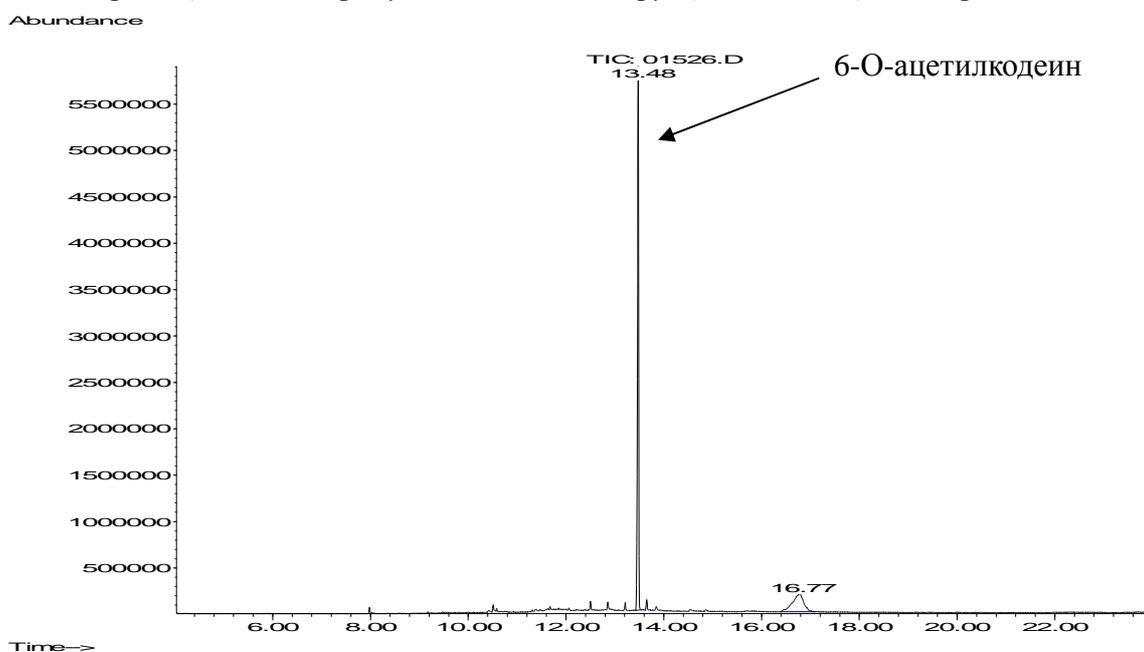


Рис. 2. Хроматограмма абиотического контроля – раствора КФ 0,004% в фосфатном буферном растворе (рН 7,0) в виде ацетилderivата

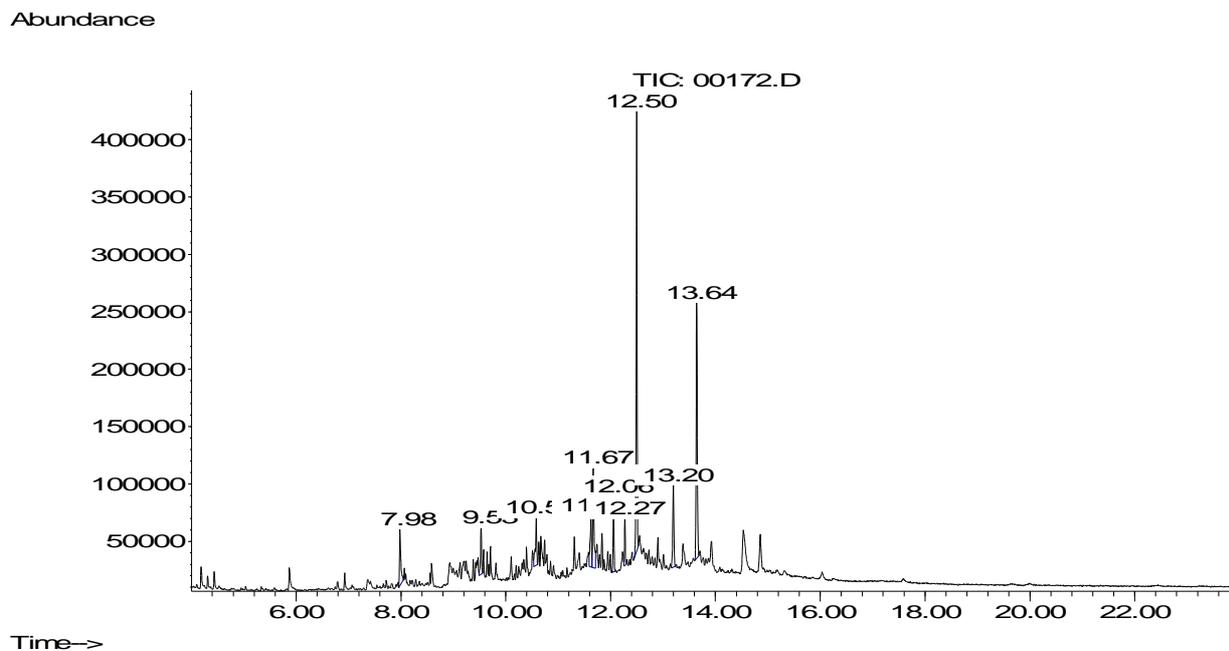


Рис. 3. Хроматограмма раствора плацебо – центрифугата клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 647 в фосфатном буферном растворе (pH 7,0)

На основании изучения характера масс-фрагментации полученных дериватов продуктов биодеструкции КФ обработаны и описаны их масс-спектральные характеристики, дополненные газо-хроматографическими данными (табл. 1).

**Таблица 1**

Масс-спектральные характеристики и газо-хроматографические данные дериватов КФ и продуктов его биодеструкции

Соединение (m/z опорного иона)	t <sub>r</sub> , мин	Относительная площадь пика, %	Характеристические ионы, m/z
6-О-ацетилкодеин (341)	13,48	1,2	341,282,229
Гидрокодон (299)	13,25	4,5	299,242,214
Кодеинон (297)	13,17	25,5	297,229,214
14-Ацетоксикодеоин (312)	13,49	68,8	355,312 ,229

Среди идентифицированных веществ (6-О-ацетилкодеина, гидрокодона, кодеинона и 14-ацетоксикодеоина) наиболее высокое относительное содержание в спектрах целевых соединений наблюдалось у 14-ацетоксикодеоина (68,8%).

С целью сокращения времени анализа и упрощения процедуры пробоподготовки нами были исследованы также пробы культуральной жидкости родококков без проведения дериватизации. Хроматограмма экстракта пробы культуральной жидкости родококков без предварительной дериватизации, а также относительное содержание кодеина и продуктов его биодеструкции в культуральной жидкости родококков в данных условиях пробоподготовки представлены на рис. 4 и в табл. 2.

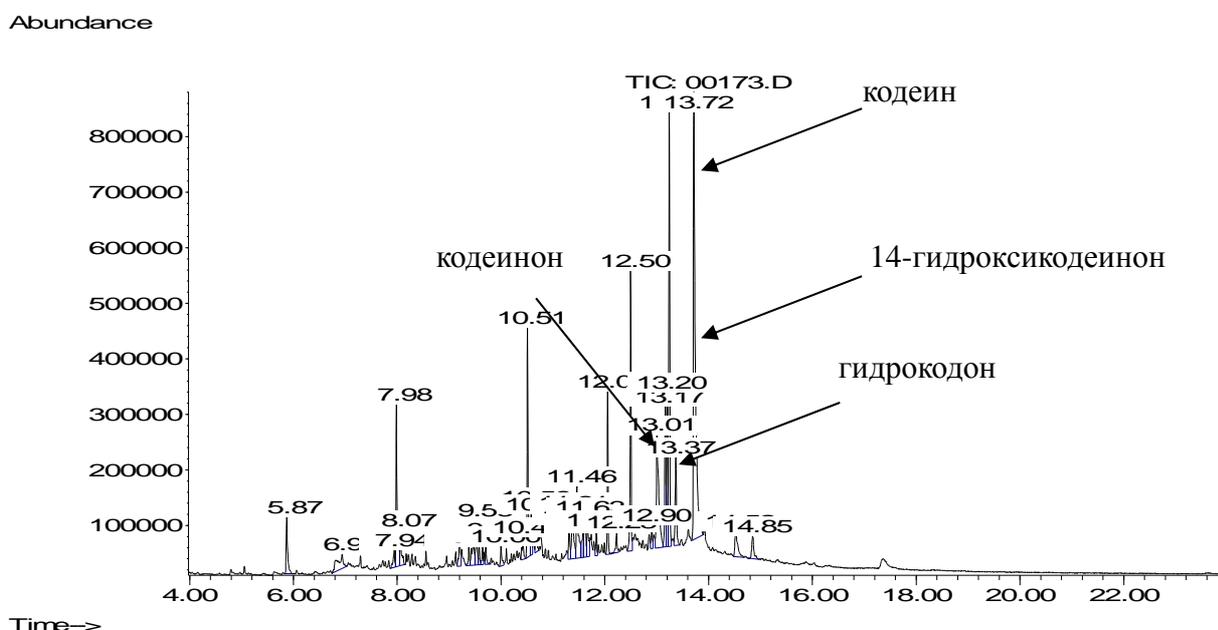


Рис. 4. Хроматограмма экстракта культуральной жидкости родококков, содержащего КФ и продукты его биодеструкции

Результаты анализа масс-спектров и хроматограмм недериватизованных компонентов культуральных жидкостей (рис. 4) показали, что среди продуктов биодеструкции КФ на 26 сут детектировался гидрокодон, (3,6-дигидрокси-N-метил-4,5-эпоксиморфинен-7,  $m/z=299$ ), кодеинон (5- $\alpha$ , 6- $\alpha$ )-7,8-дидегидро-4,5-эпокси-3-метокси-17-метилморфинан-6-он,  $m/z =297$ ) и 14-гидрокси Кодеинон (7,8-дидегидро-4,5-эпокси-14-гидрокси-3-метокси-17-метилморфинан-6-он,  $m/z=313$ ) с наибольшим выходом (57,1%) по сравнению с другими идентифицированными веществами (табл. 2).

Таблица 2

Относительное содержание кодеина и продуктов его биодеструкции в культуральной жидкости *R. rhodochrous* ИЭГМ 647 (внутренняя нормализация)

Вещество	Относительное содержание, %
Кодеин	1,18
Гидрокодон	6,41

Кодеинон	35,3
14-Гидрокси Кодеинон	57,1

При сравнении результатов, полученных в разных условиях пробоподготовки, установлено, что основные продукты биодеструкции КФ – кодеинон и гидрокодон имеют большие значения относительного содержания в экстракте культуральной жидкости без дериватизации. Однако содержание недериватизованного 14-гидрокси кодеинона оказалось несколько меньше (57,1%) по отношению к его деривату (68,8%), а содержание кодеина сохранилось на одном уровне (1,18% и 1,2%). Таким образом, оценивать относительное содержание КФ и его метаболитов в культуральной жидкости родококков эффективнее без использования дериватизации.

На основании данных ГХ-МС анализа составлена схема биотрансформации кодеина клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 647 (рис. 5).

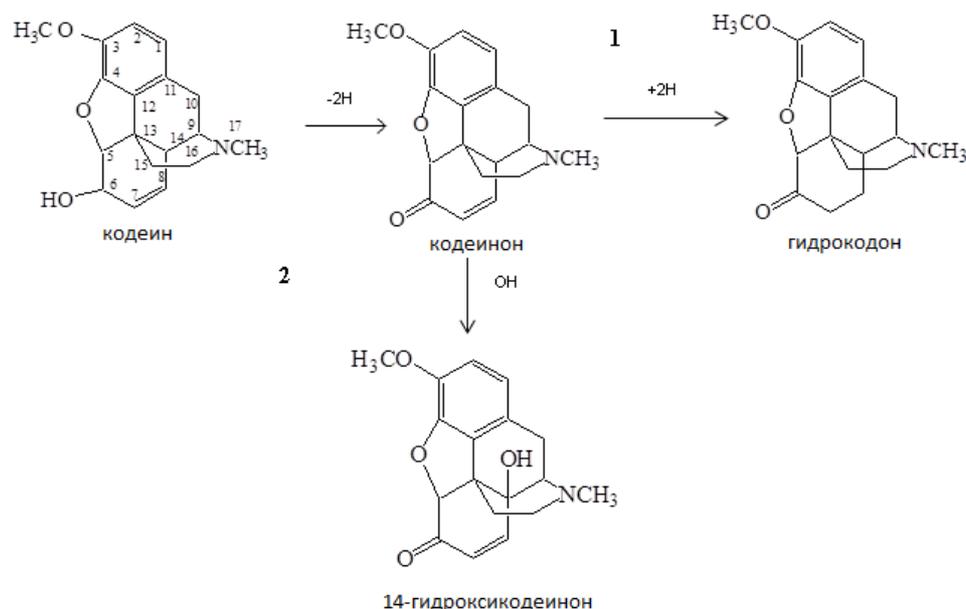


Рис. 5. Схема биотрансформации кодеина клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 647

Как видно из схемы (рис. 5), модификации молекулы кодеина могут протекать по двум направлениям. Первое направление (1): в результате реакции дегидрирования кодеина в 6 положении образуется кодеинон, который, в свою очередь, восстанавливается в положениях 7-8 до гидрокодона. Второе направление (2) соответствует превращению кодеина в кодеинон в результате реакции дегидрирования в 6 положении с последующим превращением кодеинона в 14-гидрокси кодеинона в результате реакции гидроксирования в 14 положении. Цикл морфинана в процессе биодеструкции КФ клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 647 не разрушается.

Следует отметить, что образующийся в процессе биодеструкции 14-гидрокси Кодеинон является важным промежуточным веществом в синтезе 14-гидроксиноморфинов, широко используемых наркотических анальгетических средств, а также антагонистов опиатных рецепторов – оксикодона, норксиморфона, налтрексона и др. [3]. Данные соединения 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-гидроксиноморфинов из более доступных по сравнению с тебаином веществ – Кодеина и морфина, содержащихся в природном сырье в количестве 2 % и 10 %, соответственно. Так, например, производят шестистадийную химическую трансформацию Кодеина в норкоксикодон и далее в норксиморфон с использованием полученного фотохимическим способом синглетного кислорода, или прямым аллиловым окислением Кодеина хромовой кислотой в соответствующие 14-гидроксипроизводные морфина [3]. Этим процессам свойственны недостатки, заключающиеся в низких выходах целевого продукта, продолжительности во времени, использовании тяжелых металлов, оказывающих негативное влияние на окружающую среду. Биотрансформация Кодеина с использованием штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 647 позволяет получить 14-гидрокси Кодеинон, минуя стадии превращения Кодеина в тебаин с дальнейшим окислением последнего в 14-гидроксизамещенные морфины. Данный способ получения 14-гидрокси Кодеинона описан в работе Lister D. L. *et. al.* с использованием в качестве штамма – биодеструктора *Pseudomonas putida* m10 [8]. Выход 14-гидрокси Кодеинона при использовании *Pseudomonas putida* m10 и *R. rhodochrous* ИЭГМ 647 составил 24,0 и 57,1 %, соответственно. Таким образом, использование клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 647 может быть перспективно для получения 14-гидрокси Кодеинона.

### **Заключение**

Методом газовой хроматографии–масс-спектрометрии идентифицированы основные продукты биодеструкции Кодеина фосфата клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 647: Кодеинон, гидрокодон и 14-гидрокси Кодеинон, последний из которых является важным промежуточным звеном в синтезе наркотических анальгетиков и их антагонистов.

### **Список литературы**

1. Гетьман М.А. Лекарственные средства в окружающей среде/ М.А. Гетьман, И.А. Наркевич// Ремедиум. – 2013. - № 2. – С. 50–54.
2. Регистр лекарственных средств России [Электронный ресурс]: официальный сайт. – Электрон.дан. – Режим доступа: [http:// www.rlsnet.ru/](http://www.rlsnet.ru/) (дата обращения: 03.06.2015).

3. Шан Б., Арис Х.; Янсонг Лу, Бен-Ий Джи. Способы получения 14-гидроксиноморфинонов, промежуточные соединения // Патент РФ № 2183636. 2002.
4. 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 15.05.2015).
5. Duca G. Pharmaceuticals and personal care products in the environment/ G. Duca, V. Boldescu// The role of ecological chemistry in pollution research and sustainable development / Eds A.M. Bahadir, G. Duca. Dordrecht. – 2009. – P. 27–35.
6. Ivshina I. B., Vikhareva E. V., Richkova M. I., Mukhutdinova A. N., Karpenko Ju. N. Biodegradation of drotaverine hydrochloride by free and immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 608// World J. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – V. 28. – P. 2997–3006.
7. 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. – V. 16. – P. 282– 290.
8. Lister D. L. 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. – V. 181. – P. 137–144.
9. Niknam S. Bioconversion of codeine to semi-synthetic opiate derivatives by the cyanobacterium *Nostoc muscorum*/ S. Niknam, M. Ali Faramarzi, K. A. H. Rastegar// World J. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V. 26. – P. 119–123.

**Рецензенты:**

Хомов Ю.А., д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической химии ФЗО и ФДПО 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.