

На правах рукописи

**Хренков Алексей Николаевич**

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

**14.04.02 Фармацевтическая химия, фармакогнозия**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Пермь – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор фармацевтических наук, профессор **Вихарева Елена Владимировна**

**Официальные оппоненты:**

**Федосеева Людмила Михайловна** – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармации, профессор кафедры;

**Кобелева Татьяна Алексеевна** – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра химии, заведующий кафедрой.

**Ведущая организация:**

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск.

Защита диссертации состоится «24» ноября 2020 года в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2; тел. (342) 233-55-01).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (614070, г. Пермь, ул. Крупской, 46) и на сайте (<http://www.pfa.ru>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 208.068.02,  
кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**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 Каргинские 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 2 – 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.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объектами исследования** являлись АСК в виде фармацевтической субстанции (Аньцю Луань Фармасьютикал Ко., Лтд., Китай) в концентрациях 0,01– 0,25%; таблетки АСК (АО Медисорб, Россия) состава: АСК 0,5 г, крахмал картофельный 0,0237 г, тальк 0,0010 г, лактозы моногидрат 0,0240 г, поливинилпирролидон низкомолекулярный 0,0003 г, кислота стеариновая 0,0010 г; постферментационные среды родококков, содержащие ПБ АСК; фумаровая кислота (транс-будендиовая кислота, Sigma Aldrich, США); тест-культура – семена овса посевного *Avena sativa* L. при исследовании фитотоксичности ПБ АСК; зверобоя продырявленного трава *Hyperici perforati herba* (ФС.2.5.0015.15).

**Процесс биодеструкции** АСК в виде фармацевтической субстанции и таблеток клетками *R. jostii* ИЭГМ 60 осуществляли в условиях периодического культивирования на орбитальном шейкере Cetromat IS (Sartorius Stedim Biotech, Германия) при 160 об/мин и 28 °С в течение 4 – 30 сут на базе лаборатории алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов

УрО РАН (Пермь, зав. лаб. – д.б.н., проф., академик РАН Ившина И.Б.). В экспериментах по биодеструкции АСК применяли минеральную среду RS ([www.iegmcsl.ru](http://www.iegmcsl.ru)). Бактериальные клетки, предварительно выращенные в течение 5-ти сут в мясопептонном бульоне (Oxoid, Великобритания) и дважды отмытые фосфатным буферным раствором (рН 7,0) вносили в среду культивирования до концентрации  $2,1 \times 10^7$  клеток/мл. Определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) АСК в отношении бактериальной культуры проводили методом двукратных серийных разведений. Жизнеспособность бактериальных клеток определяли специфическим окрашиванием йодонитротетразолиум хлоридом (Sigma-Aldrich, США).

**Идентификацию** ПБ АСК методом ТСХ проводили на пластинах «Сорбфил» ПТСХ-П-В-УФ (ЗАО «Сорбполимер», Россия).

**Количественное содержание** АСК в постферментационных средах родококков методом обращенно-фазовой ВЭЖХ и fumarовой кислоты в составе ПБ АСК методом ВЭЖХ/МС определяли на базе лаборатории хроматографических методов анализа Пермской государственной фармацевтической академии (зав. лабораторией – к.ф.н., доц. Карпенко Ю.Н.) с использованием жидкостных хроматографов LC Prominence 20A и LCMS-8050 (Shimadzu, Япония). Регистрацию и обработку хроматографической информации проводили с использованием программы LC solution (version 1,25 rus).

**Исследование острой токсичности** ПБ АСК проводили на белых нелинейных мышцах обоего пола на базе кафедры физиологии Пермской государственной фармацевтической академии (зав. кафедрой – к.м.н., доц. Рудакова И.П.).

**Определение класса опасности** ПБ АСК для окружающей среды проводили в соответствии с методикой, утвержденной приказом Минприроды России от 04.12.2014 № 536.

**Математическое моделирование** процесса биодеструкции АСК проводили на базе кафедры вычислительной математики, механики и биомеханики Пермского национального политехнического университета (зав. кафедрой – д.т.н., проф. Столбов В.Ю.).

**Фитотоксичность** АСК и ее метаболитов определяли в отношении овса посевного *Avena sativa* L. в соответствии с Методическими рекомендациями 2.1.7.2297-07 (2007). Концентрацию веществ, вызывающую угнетение

морфометрических показателей растения (длина корней) на  $\geq 20\%$ , считали токсичной.

**Антиоксидантную активность** ПБ АСК исследовали на спектрофотометре (СФ 2000, Россия) с использованием растворов радикала ДФПГ<sup>•</sup> (Thenmozhi *et al.*, 2011). Для приготовления последнего использовали 2,2-дифенил-1-пикрилгидразильный радикал (Sigma Aldrich, США). В качестве эталона сравнения применяли аскорбиновую кислоту (Sigma Aldrich, США).

**Фитостимулирующее действие** ПБ АСК в отношении зверобоя продырявленного изучали на базе Ботанического сада им А. Г. Генкеля Пермского государственного национального исследовательского университета.

**Содержание суммы флавоноидов** в траве зверобоя продырявленного определяли спектрофотометрическим методом (ГФ XIV изд., Т. 4, 2015).

**Статистическую обработку результатов** проводили с использованием *F*-критерия Фишера и *t*-критерия Стьюдента при  $P \geq 0,95$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Результаты исследования биодеструктирующей активности родококков** в отношении АСК показали, что наиболее активным штаммом-биодеструктором данного вещества является *R. jostii* ИЭГМ 60 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, www.iegmcol.ru), с использованием которого продолжительность процесса биодеструкции АСК составляет 9 сут. В процессе биодеструкции АСК клетками *R. jostii* ИЭГМ 60 наблюдалось выраженное увеличение клеточной концентрации более чем в 100 раз (с  $2,1 \times 10^7$  до  $3,5 \times 10^9$  клеток/мл), что является подтверждением способности данного штамма к биодеструкции АСК в качестве единственного источника углерода.

### **Разработка методики определения содержания АСК в процессе биодеструкции методом обращенно-фазовой ВЭЖХ**

Хроматографическое разделение АСК (начальная концентрация 0,25 %), продуктов ее биодеструкции и других компонентов постферментационной среды, содержащей продукты жизнедеятельности бактериальных клеток и составляющие минерально-солевой среды RS, проводили на колонке, упакованной обращенно-фазовым сорбентом на основе силикагеля, модифицированного фазой C18 (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 постферментационной среды родококков 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 продукта ее гидролиза салициловой кислоты (СК) были выбраны длины волн 227 и 236 нм, соответствующие максимумам поглощения данных веществ.

В результате в качестве оптимальных выбраны следующие условия хроматографического определения АСК и продукта ее гидролиза СК в постферментационных 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 8,25 мин, СК 12,30 мин.

#### **Валидация методики количественного определения АСК в постферментационных средах методом обращенно-фазовой ВЭЖХ**

Валидацию разработанной методики проводили в соответствии с требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методикам, по показателям специфичность, линейность, прецизионность, правильность, предел обнаружения, количественное определение.

*Специфичность* выбранных хроматографических условий оценивали посредством анализа смеси 0,025 % стандартных растворов АСК и СК в воде, среды культивирования родококков RS, смеси 0,25 % АСК и СК в среде RS, а также образца постферментационной среды на 2-е сут процесса биодеструкции АСК в начальной концентрации 0,03 % (рисунок 1). Время удерживания АСК и СК в среде RS (рисунок 1в) и постферментационной среде родококков (рисунок 1г) совпадало с

соответствующим временем удерживания аналитов в стандартных водных растворах (рисунок 1а). Установлено отсутствие мешающего влияния посторонних хроматографических пиков компонентов среды RS (рисунок 1б) и продуктов биодеструкции на определение АСК и СК в постферментационной среде родококков.

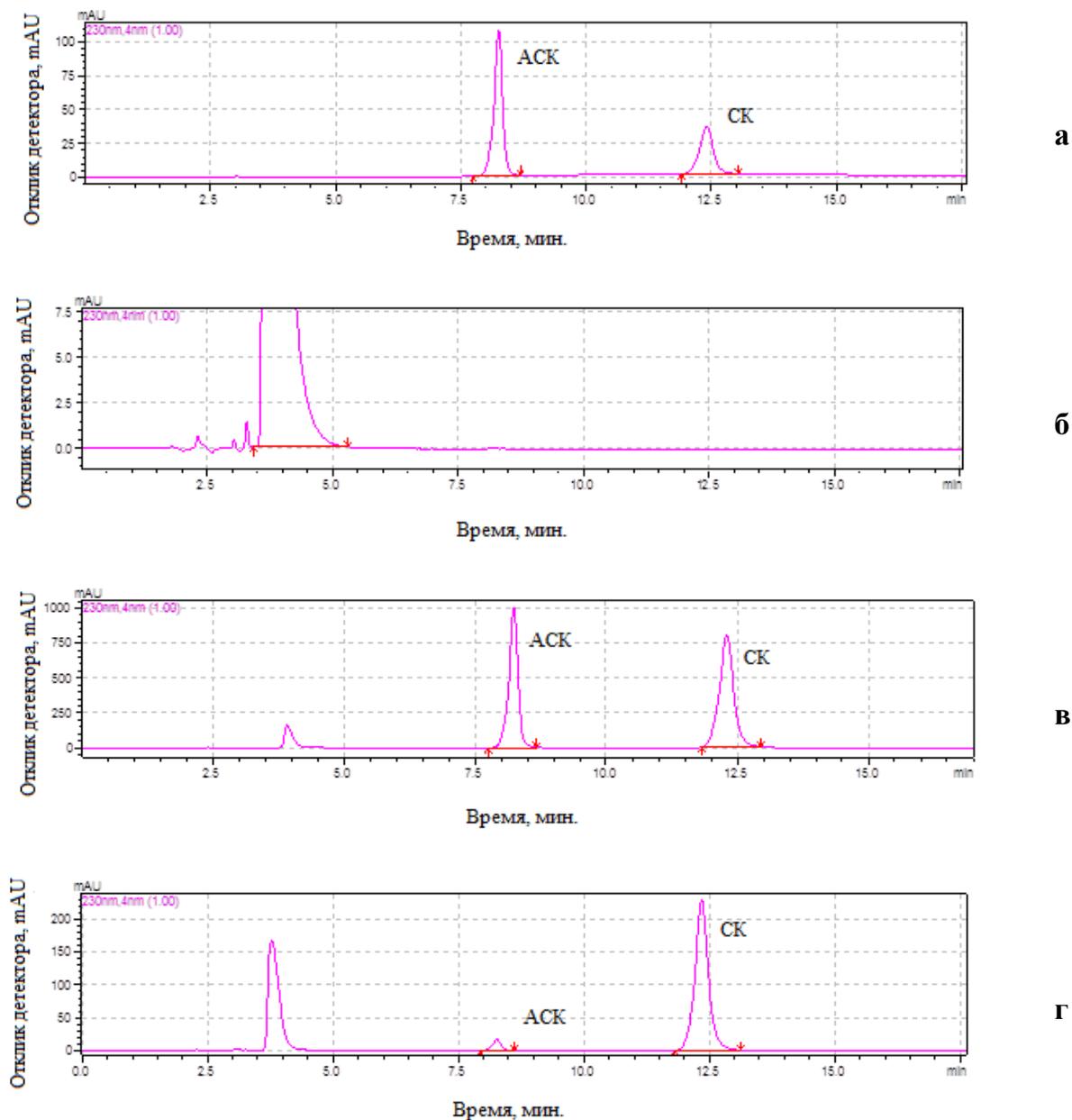


Рисунок 1 – Хроматограммы 0,025 % стандартных растворов АСК и СК в воде (а), среды RS (б), 0,25 % растворов АСК и СК в среде RS (в), образца постферментационной среды на 2-е сут процесса биодеструкции АСК (г)

Нижний предел количественного определения (НПКО) АСК и СК для разработанной методики составил 0,0001%. 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 ( $\epsilon$ , %) результатов измерения (таблица 1).

**Таблица 1 – Оценка правильности и прецизионности методики определения АСК и СК в модельных смесях методом ВЭЖХ**

| Концентрация, % | SD        |           | RSD, % |       | $\epsilon$ , % |       |
|-----------------|-----------|-----------|--------|-------|----------------|-------|
|                 | АСК       | СК        | АСК    | СК    | АСК            | СК    |
| 0,0001          | 0,0000150 | 0,0000150 | 14,28  | 14,78 | -3,30          | -4,00 |
| 0,0003          | 0,0000208 | 0,0000251 | 6,71   | 8,56  | 3,33           | -2,33 |
| 0,1             | 0,0000567 | 0,0089883 | 7,52   | 9,12  | 0,05           | -1,50 |
| 0,2             | 0,0107000 | 0,0142000 | 5,17   | 7,06  | 3,50           | 0,50  |

Полученные данные не превышают 15%, что удовлетворяет критериям приемлемости, предъявляемым к биоаналитическим методикам.

*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.

### **Определение количественного содержания АСК в процессе биодеструкции**

Разработанную методику использовали для определения остаточного содержания АСК в процессе биодеструкции. Поскольку установленное нами значение МПК АСК в отношении клеток *R. jostii* ИЭГМ 60 равно 500 мг/л, то максимальная начальная концентрация АСК в постферментационных средах может составлять не более 0,05%. Поэтому в первоначальных экспериментах процесс биодеструкции проводили с использованием нативной АСК в концентрации 0,01 – 0,05% (100 – 500 мг/л) без добавления гидрокарбоната натрия.

**Таблица 2 – Динамика изменения содержания АСК (0,01 – 0,04 %) в виде фармацевтической субстанции в процессе биодеструкции**

| Начальная концентрация АСК, мг/л | Экспозиция, сут |       |      |      |   |
|----------------------------------|-----------------|-------|------|------|---|
|                                  | 0               | 1     | 2    | 3    | 4 |
| 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%.

Как видно из таблицы 2, продолжительность процесса биодеструкции АСК при малых концентрациях соответствует 4 сут. При концентрации АСК 0,05 % процесс биодеструкции не происходит вследствие подавления жизнедеятельности бактериальных 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 гидрокарбоната натрия до значения рН, равного 6,7, что по нашим данным является оптимальным для жизнедеятельности используемых бактериальных клеток. Продолжительность процесса биодеструкции в связи с увеличением концентрации АСК с 0,01 % до 0,25 % увеличилась с 4 до 11 сут. Следует отметить, что продолжительность процесса биодеструкции АСК (0,25%) в виде таблеток оказалась почти в 2 раза меньше (6 сут), чем фармацевтической субстанции (таблица 3).

**Таблица 3 – Динамика изменения содержания АСК (0,25%) в виде фармацевтической субстанции и таблеток в процессе биодеструкции**

| Название вещества | Экспозиция, сут |       |       |       |      |       |      |      |     |
|-------------------|-----------------|-------|-------|-------|------|-------|------|------|-----|
|                   | 0               | 3     | 4     | 5     | 6    | 7     | 9    | 10   | 11  |
| 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.

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 поливинилпирролидона (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 (таблица 3). Значение рН постферментационной среды остается в пределах от 6,5 до 7,2 на протяжении всего процесса биодеструкции АСК в присутствии вспомогательных веществ таблеток.

### Математическое моделирование процесса биодеструкции АСК

Для сравнительного анализа скорости биодеструкции АСК в виде фармацевтической субстанции и таблеток использовали кинетическое уравнение первого порядка  $dx/dt = -kx$  с начальным условием  $x_0 = 100\%$  при  $t = 0$ . Значения параметра скорости биодеструкции  $k$  определяли с применением метода наименьших квадратов по данным таблиц 2, 3. Помимо этого, согласно выражению  $t_{1/2} = \ln(2)/k$  определяли период полураспада АСК в процессе биодеструкции. Результаты кинетического моделирования представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Параметр скорости биодеструкции и период полураспада АСК

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

Как следует из данных таблицы 4, при увеличении начальных концентраций АСК с 0,01 до 0,04 % значения параметра  $k$  скорости процесса биодеструкции уменьшились с 1,82 до 1,44 сут<sup>-1</sup>. 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 0,69 до 0,77 сут<sup>-1</sup> при уменьшении периода полураспада АСК на 10%. Использование АСК (0,25 %) в таблетированной лекарственной форме увеличило параметр скорости до 0,83 сут<sup>-1</sup> и уменьшило период полураспада на 17 % по сравнению с фармацевтической субстанцией.

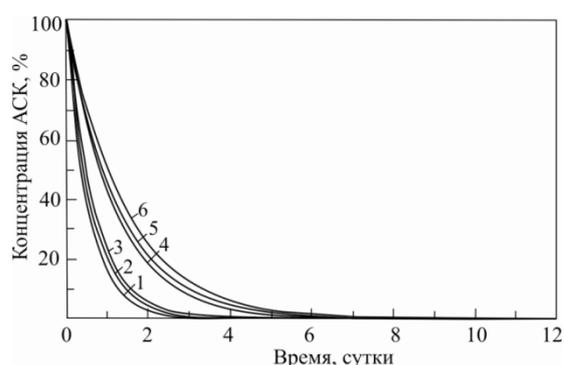


Рисунок 2 – Кинетические кривые изменения концентрации АСК в процессе биодеструкции (нумерация кривых соответствует вариантам опыта в таблице 4).

Кинетические кривые, характеризующие изменение остаточной концентрации АСК в постферментационных средах, образуют две группы, характерные для малых и больших начальных концентраций АСК (рисунок 2). Каждая группа кривых хорошо соответствует полученным экспериментальным данным (таблицы 2,3).

**Идентификация продуктов биодеструкции АСК методом ТСХ.** Для разделения АСК и возможных продуктов ее биодеструкции методом ТСХ 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 веществ осуществляли в УФ свете при длине волны 254 нм (таблица 5).

Таблица 5 – Значения Rf АСК и возможных продуктов ее биодеструкции 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, транс</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-х определений; «–» зона вещества не обнаружена.

Как видно из таблицы 5, система (2) этилацетат – этанол 96% – ледяная уксусная кислота (80:80:5) позволяет эффективно разделять исследуемые вещества и получать коэффициенты удерживания в оптимальном диапазоне. При определении способа детектирования и пределов обнаружения исследуемых веществ установлено, что 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 (таблица 6).

**Таблица 6 – Пределы обнаружения АСК и возможных продуктов ее биодеструкции при различных способах детектирования**

| Исследуемые вещества               | Детектор                 |                   |           |
|------------------------------------|--------------------------|-------------------|-----------|
|                                    | УФ свет                  | FeCl <sub>3</sub> | 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                      | –                 | –         |

Для оценки повторяемости результатов параллельных определений значений Rf хроматографическую подвижность АСК и возможных продуктов ее биодеструкции изучали в трехкратной повторности в выбранной системе растворителей. Результаты считали сходящимися (repeatability) при условии  $|X_1 - X_n| < L(P, m) \times S$  (таблица 7).

**Таблица 7 – Оценка повторяемости результатов параллельных определений коэффициентов подвижности АСК и возможных продуктов ее биодеструкции**

| Исследуемые вещества               | Метрологические характеристики (n=3, P=95%, L=3,31) |                |                |                 |        |         |
|------------------------------------|---|----------------|----------------|-----------------|--------|---------|
|                                    | X <sub>1</sub>                                      | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | X <sub>ср</sub> | S      | LxS     |
| 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 |

Данные таблицы 7 свидетельствуют о повторяемости (сходимости) измерений коэффициентов подвижности АСК и возможных продуктов ее биодеструкции.

Разработанная методика использована для динамического детектирования АСК и ее метаболитов в процессе биодеструкции АСК. При этом использовали

постферментационные среды, 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 – 22 и 11 сут соответственно (таблицы 8, 9).

**Таблица 8 – Хроматографические характеристики АСК и ее метаболитов 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. Значения Rf – средние по результатам 3-х измерений.

Как видно из таблицы 8, при проведении процесса биодеструкции при рН 6,0 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 *цис, цис*-муконовая кислота, что свидетельствует об их дальнейшем разложении. Гидрохинон в культуральной жидкости не обнаружен. На начальных этапах процесса биодеструкции АСК при рН 6,9 в постферментационных средах присутствует гентизиновая кислота, на конечном этапе – фумаровая кислота (таблица 9).

**Таблица 9 – Хроматографические характеристики АСК и ее метаболитов в процессе биодеструкции при рН 6,9**

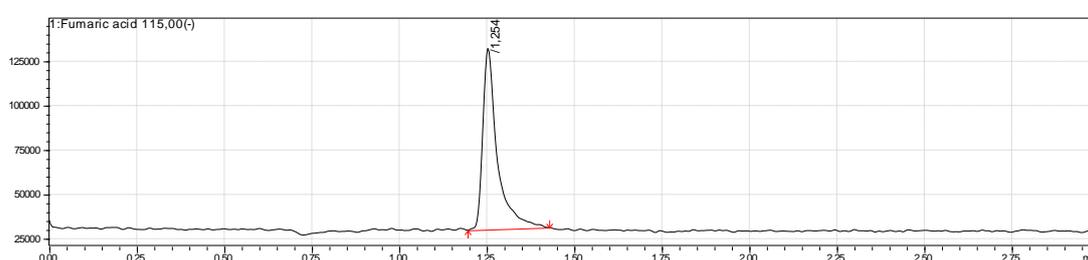
| Время, сутки | Значение Rf обнаруженного вещества |                      |                   |
|--------------|------------------------------------|----------------------|-------------------|
|              | АСК                                | Гентизиновая кислота | Фумаровая кислота |
| 1            | 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. Значения Rf – средние по результатам 3-х измерений.

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

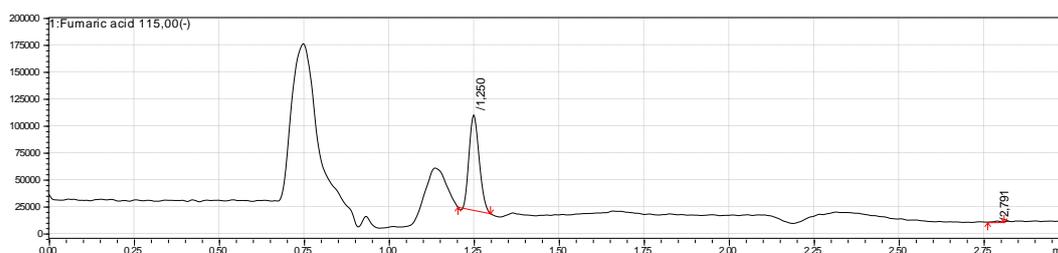
### **Исследование химического состава продуктов биодеструкции АСК методом ВЭЖХ/МС**

В качестве объектов исследования использовали постферментационные среды, полученные в процессе биодеструкции АСК при рН 6,9 и содержащие фумаровую кислоту. Установлено, что время удерживания фумаровой кислоты при анализе ее стандартного водного раствора (400 нг/мл) составило 1,25 мин (рисунок 3).



**Рисунок 3 – Хроматограмма стандартного водного раствора фумаровой кислоты (400 нг/мл).**

На хроматограмме образца постферментационной среды в данных условиях обнаруживался пик со временем удерживания, соответствующим времени удерживания фумаровой кислоты (рисунок 4).



**Рисунок 4 – 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 которых присутствовали ионы 115 (молекулярный депротонированный) и фрагментные ионы с массами 71 и 69 (рисунки 5, 6). Концентрация фумаровой кислоты в постферментационной среде на 8-е сутки процесса биодеструкции АСК (0,25 %) составила 6,6 мкг/мл.

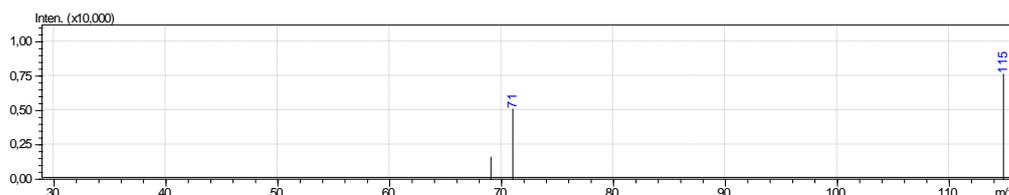


Рисунок 5 – Вторичный масс-спектр фумаровой кислоты (стандартный раствор).

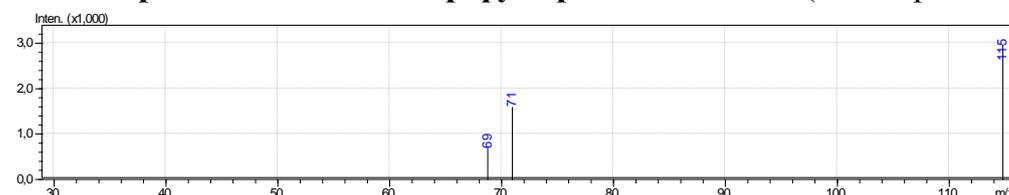


Рисунок 6 – Вторичный масс-спектр пика со временем удерживания 1,25 мин в образце постферментационной среды на 8-е сут биодеструкции АСК (0,25 %).

На основании полученных экспериментальных данных разработана схема разложения АСК клетками *R. jostii* ИЭГМ 60, представленная на рисунке 7.

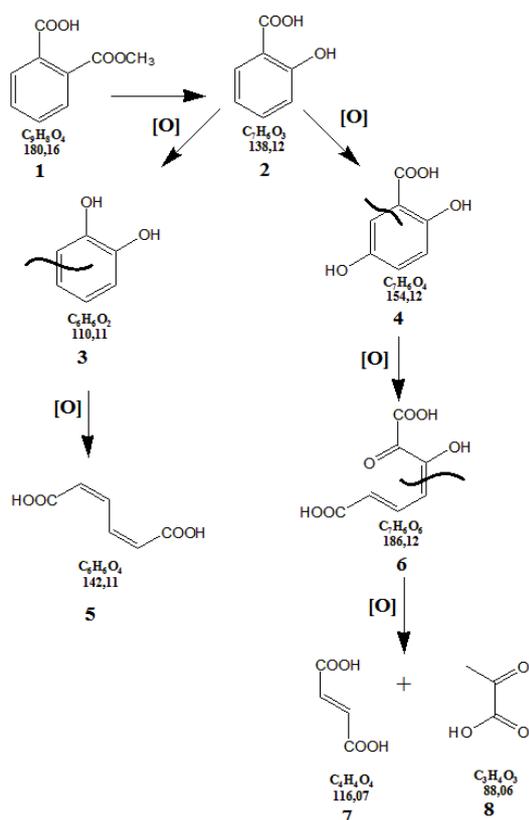


Рисунок 7 – Схема процесса биодеструкции АСК клетками *R. jostii* ИЭГМ 60:

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

В зависимости от условий, биодеструкция АСК клетками *R. jostii* ИЭГМ 60 может происходить 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). Вторым путем – через гидрокселирование 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.

### Антиоксидантная активность продуктов биодеструкции АСК

На рисунке 8 показано изменение оптической плотности растворов радикала ДФПГ• при внесении в него растворов ПБ АСК и аскорбиновой кислоты различной концентрации.

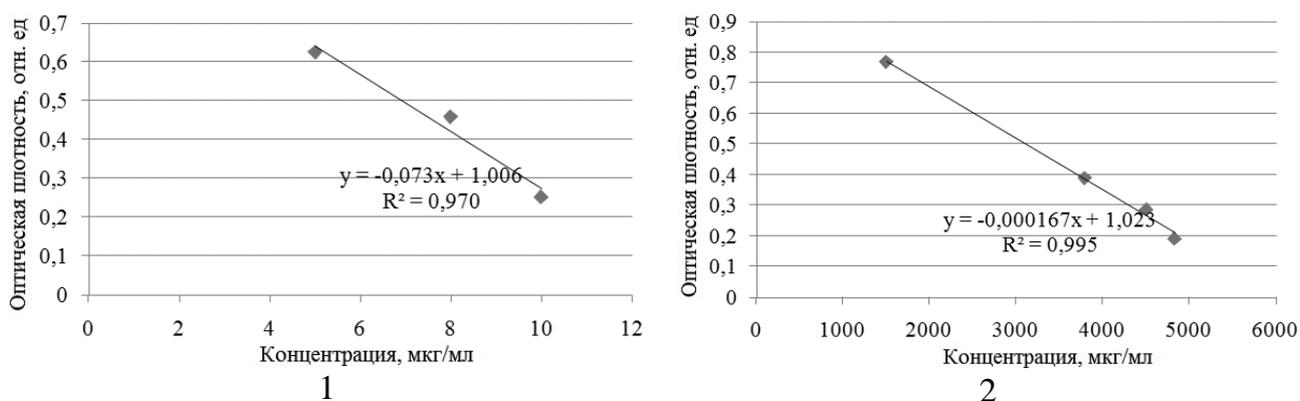


Рисунок 8 – Зависимость оптической плотности раствора ДФПГ• от концентрации аскорбиновой кислоты (1) и ПБ АСК (2).

Установленная по уравнению линейной регрессии антиоксидантная активность ПБ АСК составила 0,0023 г-экв аскорбиновой кислоты /1 г ПБ АСК.

### Токсические свойства и фитостимулирующая активность продуктов биодеструкции АСК

Исследование острой токсичности ПБ АСК при пероральном введении белым нелинейным мышам показало, что средняя летальная доза ЛД<sub>50</sub> ПБ АСК составила 2580,0 мг/кг, что соответствует 3 классу токсичности (умеренно токсичные вещества). В сравнении с ЛД<sub>50</sub> АСК (1410,0 мг/кг) острая токсичность ПБ АСК почти в 2 раза меньше, чем исходного вещества. Установленное значение ЛД<sub>50</sub> ПБ АСК использовали для расчета их класса опасности для окружающей природной среды. В концентрации 2500 мг/кг ПБ АСК относятся к IV классу опасности, то есть являются мало опасными для окружающей среды.

Исследование фитотоксичности ПБ АСК показало, что они не оказывают токсических эффектов на тест-культуру – семена овса посевного (таблица 10).

Таблица 10 – 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                   | $t = 3,61$<br>$t_{кр} = 2,01$     |
| Продукты биодеструкции АСК   | 38±2,9                   | $t = 0,40$<br>$t_{кр} = 2,01$     |

Поскольку в составе ПБ АСК присутствует фумаровая кислота, то представляло интерес исследовать влияние концентрации данного вещества на фитоэффект в условиях лабораторного эксперимента.

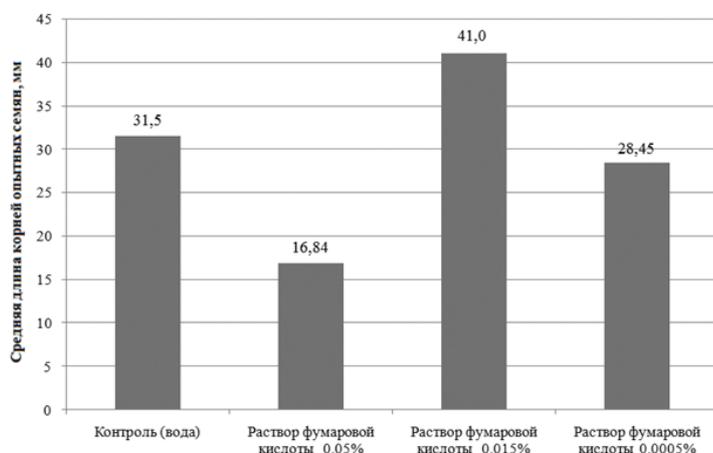


Рисунок 9 – Зависимость средней длины корней проростков семян овса посевного от концентрации фумаровой кислоты.

Как видно из рисунка 9, фумаровая кислота в концентрации 0,015% оказывает стимулирующий эффект, а в концентрации 0,05% – угнетающий эффект в отношении тест-культуры – семян овса посевного. При концентрации фумаровой кислоты 0,0005% фитоэффект наблюдается на уровне контроля с водой.

**Исследование фитостимулирующего действия ПБ АСК в отношении лекарственного растения (зверобоя продырявленного) в условиях полевого эксперимента**

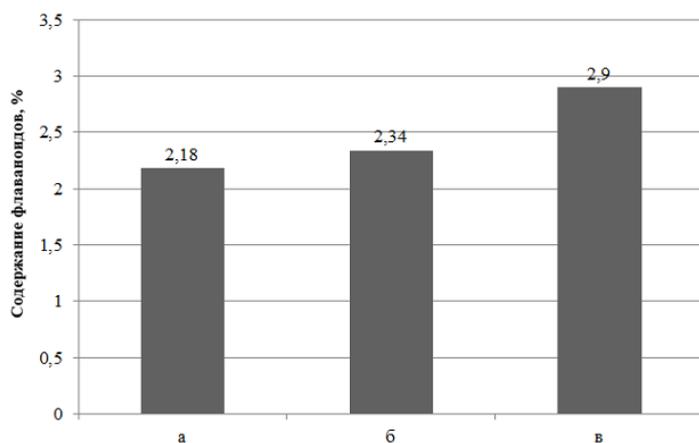


Рисунок 10 – Содержание флавоноидов в траве зверобоя продырявленного: а – растения контрольной площадки, б – растения обработаны ПБ АСК, в – растения обработаны раствором фумаровой кислоты 0,015%.

Как видно из рисунка 10, ПБ АСК, содержащие фумаровую кислоту, оказывают положительный эффект на динамику накопления флавоноидов в траве зверобоя продырявленного. Нативная фумаровая кислота в концентрации 0,015% оказывает существенный стимулирующий эффект на зверобой продырявленный, увеличивая концентрацию флавоноидов в траве на 33% по сравнению с контролем (водой), что подтверждает результаты лабораторного эксперимента.

### **ВЫВОДЫ**

1. Разработаны методики хроматографического анализа ацетилсалициловой кислоты и ее бактериальных метаболитов, пригодные для их динамической идентификации 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 рН 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.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

*Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ*

1. Определение салицилата натрия и продуктов его биодеструкции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / **А.Н. Хренков**, Е.В. Вихарева, Е.В. Тумилович, Ю.Н. Карпенко, М.И. Рычкова, Е.А. Тюмина // Биофармацевтический Журнал. – 2019. – Т. 11. – № 1. – С. 31-35.

2. Хренков, А.Н. Идентификация гентизиновой 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.

*Публикации в других журналах и сборниках*

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

2. 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. – С. 122.

3. Хренков, А.Н. Исследование продолжительности процесса бактериальной деструкции салицилата натрия / А.Н. Хренков, Е.В. Вихарева // Сб. материалов VII международного молодежного медицинского конгресса «Санкт-Петербургские научные чтения – 2017». СПб, 6-8 декабря 2017. – С. 419.

4. 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.

5. Хренков, А.Н. Хроматографический анализ и кинетическое моделирование процесса биодеструкции ацетилсалициловой кислоты / А.Н. Хренков, Е.В. Вихарева // Материалы II Международной научно-практической конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни». Пермь, 17 сентября 2018. – С. 130-132.

6. 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.

7. 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.

8. Хренков, А.Н. Исследование токсичности продуктов бактериальной деструкции салицилата натрия / А.Н. Хренков, Е.В. Вихарева, И.П. Рудакова // Сборник материалов XXVI Российского национального конгресса «Человек и

лекарство». Москва, 8-11 апреля 2019. М.: ЗАО РИЦ «Человек и лекарство», 2019. – С. 141.

9. 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.

10. Числовые характеристики кинетически моделируемого простого нестационарного случайного процесса / А.А. Селянинов, М.А. Осипенко, А.А. Баранова, Е.В. Вихарева, А.Н. Хренков // Прикладная математика и вопросы управления. – 2019. – № 3. – С. 65-83.

Хренков Алексей Николаевич (Россия)

**Химический состав и фитостимулирующее действие продуктов бактериальной деструкции ацетилсалициловой кислоты**

Разработаны методики идентификации продуктов биодеструкции и динамического хроматографического определения содержания ацетилсалициловой кислоты в постферментационных средах родококков. Определен химический состав образующихся метаболитов и основные пути разложения ацетилсалициловой кислоты. Показано, что продукты биодеструкции умеренно токсичны, мало опасны для окружающей природной среды и проявляют фитостимулирующее действие в отношении лекарственных растений (зверобоя продырявленного *Hypericum perforatum* L.), обусловленное присутствием в их составе фумаровой кислоты.

Khrenkov Alexey Nikolaevich (Russia)

**Chemical composition and fitostimulin the effect of the products of bacterial degradation of acetylsalicylic acid**

Methods for identifying of the biodegradation products and dynamic chromatographic determination of acetylsalicylic acid content in post-fermentation media fluid of *Rhodococcus* have been developed. The chemical composition of the resulting metabolites and the main pathways of decomposition of acetylsalicylic acid have been determined. It is shown that the products of biodestruction are mildly toxic, not dangerous to the environment and exhibit a phytostimulating effect on medicinal plants (*Hypericum perforatum* L.), due to the presence of fumaric acid in their composition.