

УДК 54.062+ 615.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В КОНТРОЛЕ ПРОТЕКАНИЯ ПРОЦЕССОВ ХИМИЧЕСКОЙ ДЕСТРУКЦИИ ПРОИЗВОДНЫХ 5-НИТРОИМИДАЗОЛА НА ПРИМЕРЕ МЕТРОНИДАЗОЛА

Михайлова Н.И., Лукашов Р.И.

УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

В статье представлены результаты исследования процессов химической деструкции производных 5-нитроимидазола на примере метронидазола с применением метода высокоеффективной жидкостной хроматографии. Актуальность работы обусловлена необходимостью уменьшения остаточных количеств антимикробных лекарственных препаратов в окружающей среде. В качестве объекта исследования использовалась фармацевтическая субстанция метронидазола, подвергнутая воздействию различных деструктивных факторов: гидролизу (в нейтральной, кислой, слабокислой, щелочной и слабощелочной среде) и окислению (с применением пероксида водорода 3 % и 30 % в нейтральной, слабокислой и слабощелочной среде, реактива Фентона, гипохлорита натрия и персульфата калия). Установлено, что наибольшую эффективность разрушения нативной структуры метронидазола обеспечивают гидролиз раствором гидроксида натрия, разведенного при комнатной температуре, окисление 3 %-ым раствором пероксида водорода в слабощелочной среде, использование реактива Фентона и комбинация персульфата калия с сульфатом железа (II). Выявлено, что некоторые способы (в частности, окисление гипохлоритом натрия и пероксидом водорода 30 %) приводят к неполному разрушению нативной структуры молекулы. Полученные данные могут быть использованы при разработке эффективных способов обезвреживания фармацевтических отходов, содержащих метронидазол.

Ключевые слова: метронидазол; 5-нитроимидазол; химическая деструкция; высокоеффективная жидкостная хроматография; реактив Фентона; окисление; гидролиз.

Введение. Активные фармацевтические ингредиенты лекарственных средств (далее – ЛС), обнаруживаемые в окружающей среде, представляют новый класс экополлютантов ввиду их широкого применения в медицине и ветеринарии, стойкости нативных молекул, высокой биологической активности и способности к кумулированию в тканях. Меры, направленные на снижение количества ЛС, бесконтрольно попадающих в окружающую среду, будут способствовать улучшению экологической обстановки и сохранению постоянства биологических популяций [1; 2]. Согласно исследованию ученых Йоркского университета, антибактериальные лекарственные препараты обнаружены в 66 % исследуемых реках в 72 странах мира. 111 исследуемых объектов окружающей среды содержали концентрации активных фармацевтических ингредиентов, признанные AMR Industry Alliance (организацией, созданной для принятия решений по предотвращению формирования резистентности к антимикробным препаратам) небезопасными [3].

Производные 5-нитроимидазола – антимикробные лекарственные препараты с высокой активностью и широким спектром действия в отношении инфекций, вызванных анаэробными бактериями и простейшими.

Метронидазол, представитель данной группы лекарственных средств, получил широкое распространение в клинической практике благодаря большому спектру показаний к применению как в качестве синтетического химиотерапевтического средства (терапия инфекционных заболеваний, вызванных *Bacteroides spp.*, *Eubacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Peptococcus niger*, *Peptostreptococcus spp.*, *Helicobacter pylori*), так и в качестве противопротозойного лекарственного средства (лечение лямблиоза, трихомониаза, кишечного и внекишечного амёбиаза, балантидиаза). Используется в комплексной эрадикационной терапии язвенной болезни желудка, входит в Республиканский формуляр и перечень основных лекарственных средств, а также в перечень лекарственных средств, реализуемых из аптеки без рецепта врача [4; 5; 6].

Остаточные содержания метронидазола в продукции животного происхождения не допускаются в связи с возможным генотоксическим и канцерогенным эффектом. Однако было показано, что в ряде водоемов концентрация метронидазола превышала безопасные пределы (до 300 раз в отдельных регионах Индии) [3]. Вышеизложенное указывает на необходимость совершенствования способов обезвреживания отходов метронидазола.

Цель исследования – при помощи метода высокоэффективной жидкостной хроматографии сравнить эффективность протекания процессов химической деструкции производных 5-нитроимидазола на примере метронидазола.

Материалы и методы исследования.

В качестве объекта исследования использовали субстанцию метронидазола (Wuhan Wu Yao Pharmaceutical Co., Ltd., Китай). Концентрация испытуемого вещества в рабочем растворе составила 0,5 %.

Использовали следующие подходы к химической деструкции метронидазола:

– гидролиз при pH = 6,5 в водном растворе без добавления реагентов, при pH = 4 в растворе лимонной кислоты, при pH = 2 в растворе кислоты хлористоводородной разведенной, при pH = 8 в растворе натрия гидрокарбоната, при pH = 10 в растворе натрия гидроксида разведенного. Образцы выдерживались при комнатной температуре, их также подвергали нагреванию при температуре 60 °C и 100 °C в течение трех часов, после остывания образцы хранили при комнатной температуре;

– окисление в растворе пероксида водорода 3 %-го в нейтральной среде, слабокислой (в присутствии кислоты хлористоводородной, разведенной до pH = 5,5), слабощелочной (в растворе натрия гидроксида разведенного, pH = 8) при комнатной температуре, а также при нагревании при температуре 60 °C в течение 1 часа, после остывания образцы хранили при комнатной температуре;

– окисление в растворе пероксида водорода 30 %-го в нейтральной среде, слабокислой (в присутствии кислоты хлористоводородной разведенной, до pH = 5,5), слабощелочной (в растворе натрия гидроксида разведенного, pH = 8) при комнатной температуре;

– окисление реагентом Фентона (сульфат железа (II), пероксид водорода 30 %-ый) при комнатной температуре.

– окисление в растворе персульфата калия 5,3 % при комнатной температуре, при нагревании при температуре 60 °C в течение 1 часа, после остывания образцы также хранили при комнатной температуре;

– окисление в растворе персульфата калия 5,3 %-го в присутствии сульфата железа (II) при комнатной температуре, а также при нагревании при температуре 60 °C в течение 1 часа, после остывания образцы хранили при комнатной температуре.

– окисление в растворе персульфата калия 5,3 % в присутствии сульфата железа II при комнатной температуре, а также при нагревании при температуре 60 °C в течение 1 часа, после остывания образцы также хранили при комнатной температуре;

– окисление в присутствии гипохлорита натрия.

В качестве контрольного образца использовали свежеприготовленный 0,5 %-ый водный раствор метронидазола.

Экспозицию реакционной смеси осуществляли в течение 30 суток. Анализ проводили на 1, 7, 14, 30 сутки протекания реакции.

Исследование степени протекания химической деструкции метронидазола проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием жидкостного хроматографа UltiMate3000 с флуориметрическим и диодноматричным детекторами. Обработка данных проводилась в программе «Chromeleon 7».

Хроматографическое разделение проводили на колонке ZORBAX SB-C18 длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненной силикагелем октадецилсильным для хроматографии с размером частиц 5 мкм.

Условия проводимого хроматографирования соответствовали методике для определения сопутствующих примесей статьи 07/2016:0675, приведенной в Государственной Фармакопее Республики Беларусь [7]. Используемая подвижная фаза представляла собой смесь метанола и раствора калия дигидрофосфата 1,36 г/л в соотношении 30 : 70 соответственно, скорость подвижной фазы составила 1 мл/мин. Детектирование осуществляли при длине волны 315 нм.

Для оценки влияния различных условий воздействия на нативную структуру метронидазола было рассчитано процентное изменение площади хроматографического пика, отражающее относительное изменение количества исходного вещества (формула 1):

$$X(\%) = \left| 100 - \frac{A_{\text{и.о.}(mAU)} \times 100}{A_{\text{исх.о.}(mAU)}} \right|, \quad (1)$$

где $A_{\text{и.о.}}$ – площадь хроматографического пика испытуемого образца; $A_{\text{исх.о.}}$ – площадь хроматографического пика исходного контрольного образца; X – процентное изменение площади хроматографического пика.

Оценка количества продуктов деструкции проводилась с использованием расчёта их процентного содержания по отношению к неизмененному веществу, согласно формуле (2):

$$Z(\%) = \frac{A_{\text{и.о.}(mAU)} \times 100}{A_{\text{исх.о.}(mAU)}}, \quad (2)$$

где $A_{\text{и.о.}}$ – площадь хроматографического пика испытуемого образца; $A_{\text{исх.о.}}$ – площадь хроматографического пика исходного контрольного образца; Z – процентное содержание продукта деструкции по отношению к исходному образцу.

Результаты и обсуждение. Спектр исходного образца метронидазола характеризуется наличием трех основных максимумов поглощения при длинах волн 197 нм, 230 нм и 319 нм (рис. 1). Указанные максимумы поглощения характерны для данной молекулы и служат маркерами ее химической структуры.

На рис. 2 представлена хроматограмма исходного раствора метронидазола. Площадь пика составила 263,5 mAU_{min} при времени удерживания, равном 4,5 мин.

Результаты хроматографического анализа показали, что спустя 1 месяц экспозиции не наблюдалась деструкция нативной структуры метронидазола в ходе гидролиза без добавления реагентов, в растворе кислоты хлористоводородной разведенной, гидрокарбоната натрия, кислоты лимонной при всех температурных режимах.

В ходе гидролиза в растворе гидроксида натрия разведенного происходит полное разрушение метронидазола уже на первые сутки экспозиции реакционной смеси, однако обра-

зуется большое число продуктов деструкции (с площадью пика меньше 1), не разделяемых в исследуемой подвижной фазе. Установлено, что нагревание до 100 °C не ускоряет процесс химической деструкции метронидазола, вид хроматограмм образцов, которые подвергались нагреванию при температуре 60 °C и 100 °C, не различается. Гидролиз в растворе натрия гидроксида, разведенного при комнатной температуре, также приводит к полному разрушению нативной структуры метронидазола, и образованию меньшего числа побочных продуктов деструкции (табл. 1).

При окислении метронидазола раствором пероксида водорода 3 -го% к 30-ым суткам наблюдалось снижение содержания метронидазола в реакционной смеси при нейтральном pH как при комнатной температуре (на 44,9 %), так после нагревания при 60 °C в течение

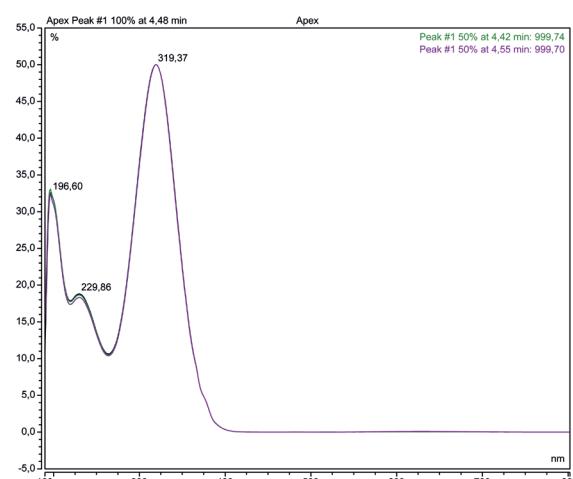


Рис. 1. Спектр поглощения исходного контрольного образца метронидазола

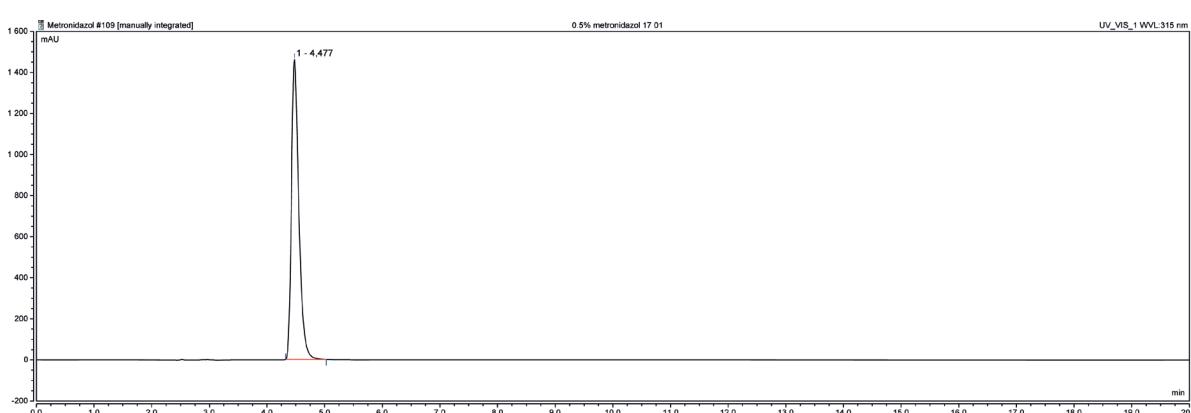
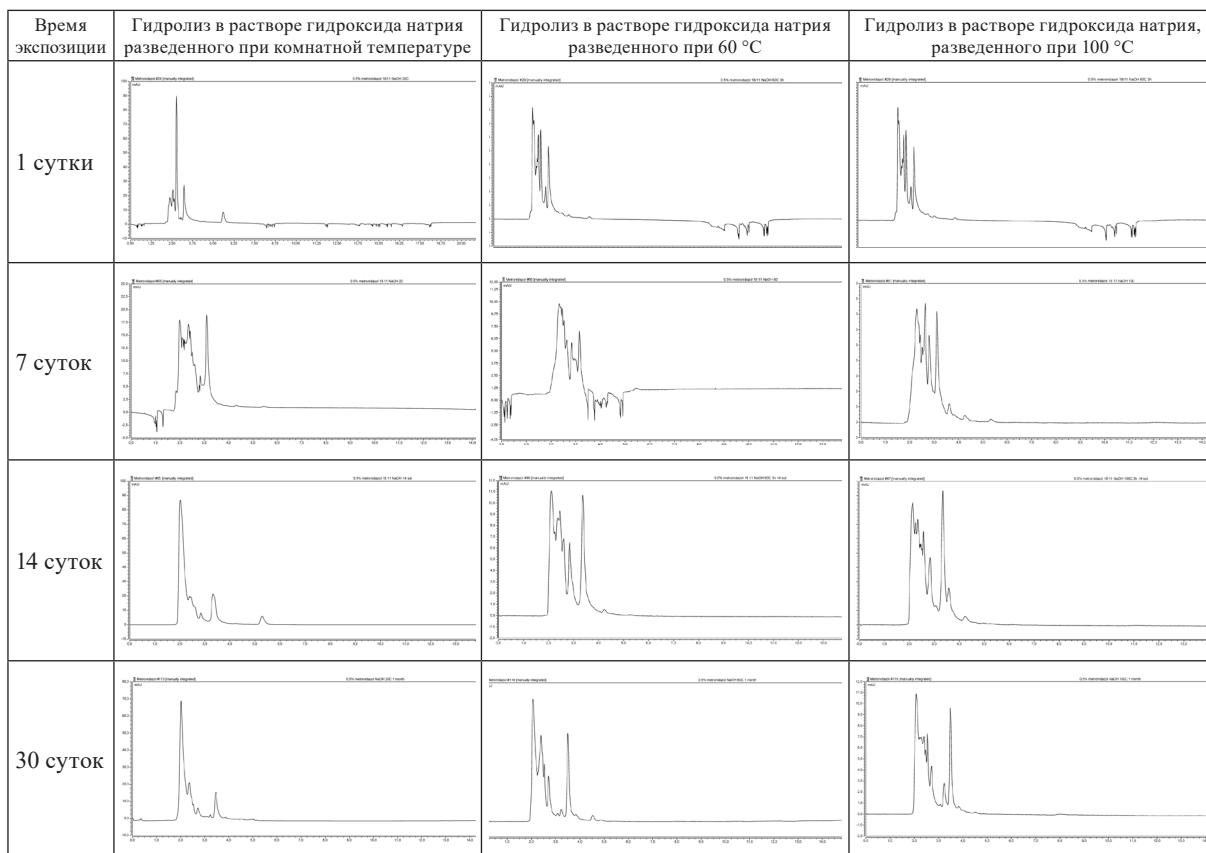


Рис. 2. Хроматограмма исходного контрольного раствора метронидазола

Таблица 1 – Хроматограммы продуктов деструкции, образовавшихся при гидролизе метронидазола в растворе гидроксида натрия, разведенного при разных температурных режимах



одного часа (47,0 %), однако нативная структура метронидазола и его спектральные и хроматографические характеристики соответствовали аналогичным у контрольного свежеприготовленного раствора.

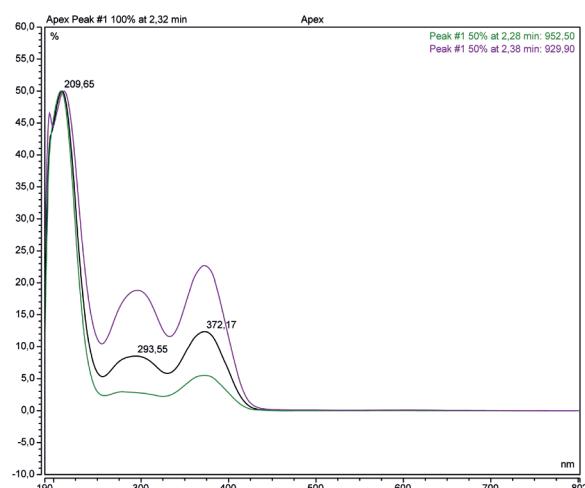


Рис. 3. Спектр поглощения основного продукта деструкции метронидазола, образовавшегося при его окислении раствором пероксида водорода 3 %-го в слабощелочной среде

При окислении метронидазола пероксида водорода раствором 3 % в слабокислой среде при комнатной температуре содержание метронидазола снизилось на 5,08 %, так, после нагревания при 60 °C в течение 1 часа – на 14,4 %, что указывает на более высокую стабильность молекулы в кислой среде. При этом увеличение концентрации пероксида водорода в реакционной смеси до 30 % не привела к интенсификации окисления метронидазола, хроматографические и спектральные характеристики также соответствовали таковым у контрольного раствора метронидазола, содержание испытуемого образца в реакционной смеси уменьшилось лишь на 18,8 %.

В процессе окисления метронидазола раствором пероксида водорода 3 %-го в слабощелочной среде образуется продукт деструкции с временем удерживания 2,3 и площадью хроматографического пика 14,57 mAU*min (рис. 3, 4). Содержание метронидазола снизилось на 99,8 %, что указывает на протекание полного разрушения его нативной структуры.

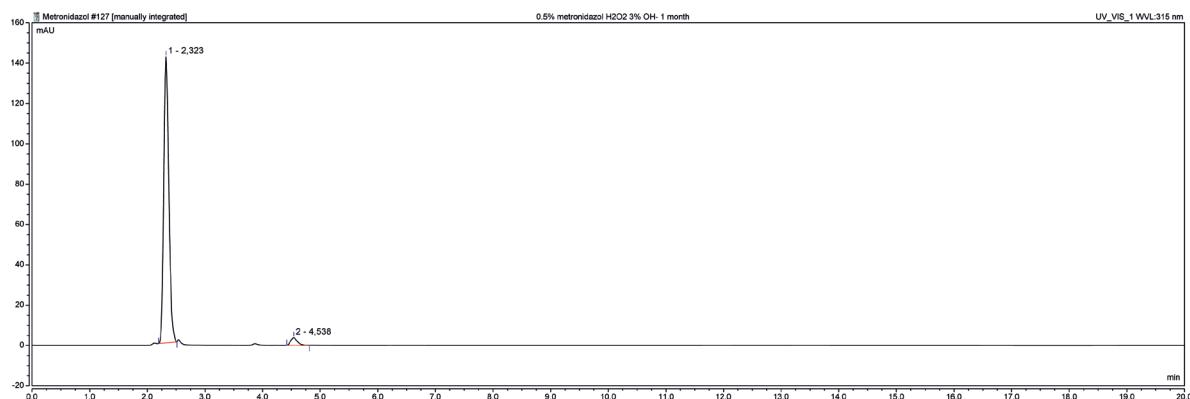


Рис. 4. Хроматограмма продуктов деструкции метронидазола, образовавшихся при его окислении раствором пероксида водорода 3 %-го в слабощелочной среде

Образование основного продукта деструкции происходило в первые сутки реакции, экспозиция до месяца не приводила к увеличению его содержания в реакционной смеси. Динамика уменьшения содержания метронидазола в реакционной смеси представлена в табл. 2.

Таблица 2 – Динамика уменьшения содержания метронидазола в реакционной смеси при его окислении раствором пероксида водорода 3 %-го в слабощелочной среде

Время экспозиции	% уменьшения площади хроматографического пика при окислении раствором пероксида водорода 3 %-го в слабощелочной среде при комнатной температуре	% уменьшения площади хроматографического пика при окислении раствором пероксида водорода 3 %-го в слабощелочной среде после нагревания в течение 1 часа при температуре 60 °C
1-е сутки	87,0	98,6
7-е сутки	99,7	99,2
14-е сутки	99,9	99,9
30-е сутки	99,8	99,9

Полученные результаты указывают на то, что нагревание до 60° С в течение часа позволяет интенсифицировать процесс деструкции в 1 сутки, однако альтернативой нагреванию является экспозиция раствора в течение 7 суток, спектральные и хроматографические характеристики указывают на аналогичность процессов.

При увеличении содержания пероксида водорода в растворе до 30 % в слабощелочной среде образование продукта деструкции, представленного выше, происходило в следовых количествах, однако полнота деструкции протекала с меньшей степенью (снижение содержания метронидазола в реакционной смеси составило 92,2 %), в течение месяца экспозиции реакционной смеси существенной динамики изменения содержания исследуемого соединения не наблюдается (рис. 5, табл. 3).

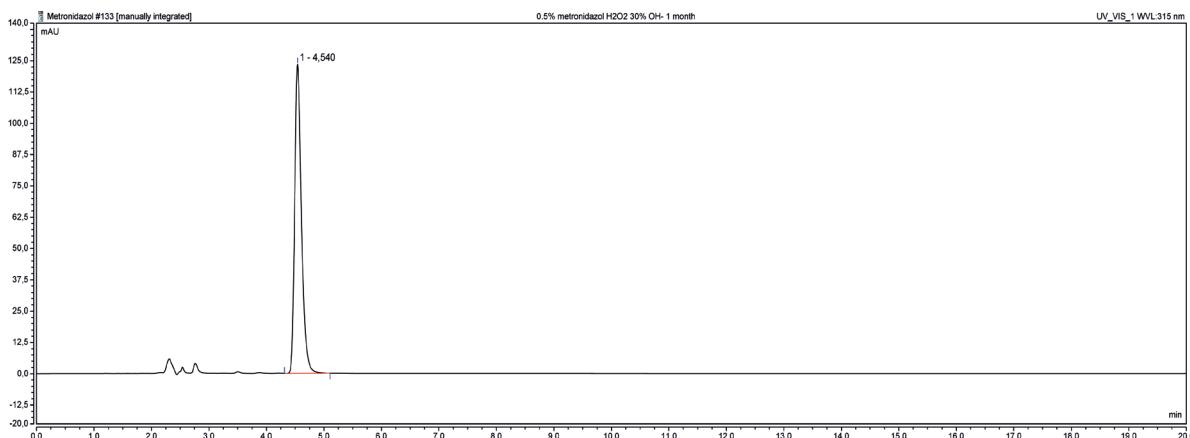


Рис. 5. Хроматограмма продуктов деструкции метронидазола, образовавшихся при его окислении раствором пероксида водорода 30 %-го в слабощелочной среде

Таблица 3 – Динамика уменьшения содержания метронидазола в реакционной смеси при его окислении раствором пероксида водорода 30 %-го в слабощелочной среде

Время экспозиции	% уменьшения площади хроматографического пика при окислении раствором пероксида водорода 30 %-го в слабощелочной среде
1-е сутки	90,3
7-е сутки	91,6
14-е сутки	92,8
30-е сутки	92,2

Персульфат калия не приводил к разрушению нативной структуры метронидазола, спустя месяц экспозиции реакционной смеси все спектральные и хроматографические характеристики сохранялись. Нагревание при температуре 60 °C в течение 1 часа интенсифицировало процесс деструкции (динамика процесса представлена в табл. 4), к 30-м суткам снижение содержания метронидазола в исследуемом образце составило 52,4 %, однако нативная структура испытуемого вещества не была разрушена.

Таблица 4 – Динамика уменьшения содержания метронидазола в реакционной смеси при его окислении раствором персульфата калия

Время экспозиции	% уменьшения площади хроматографического пика при окислении раствором персульфата калия после нагревания в течение 1 часа при температуре 60 °C
1-е сутки	12,5
7-е сутки	20,2
14-е сутки	34,9
30-е сутки	52,4

Введение в реакционную смесь сульфата железа (II) интенсифицировало процесс химической деградации метронидазола, снижение

содержания испытуемого образца к 30 суткам составило 89,5–90,2 %. Температурное воздействие не приводило к существенной интенсификации протекающих в реакционной смеси процессов (табл. 4).

Таблица 4 – Динамика уменьшения содержания метронидазола в реакционной смеси при его окислении раствором пероксида водорода 30 %-го в слабощелочной среде

Время экспозиции	% уменьшения площади хроматографического пика при окислении раствором пероксида водорода 30 %-го в слабощелочной среде
1 сутки	47,9
7 сутки	63,3
14 сутки	81,6
30 сутки	89,5

Окисление метронидазола реагентом Фентона (рис. 6) приводит к практически полному разрушению нативной структуры молекулы (снижение его содержания в реакционной смеси составило 99,9 %).

Продукты деструкции образуются в следовых количествах и имеют схожую структуру, представленную на рис. 7. При этом процесс деструкции прошел полностью спустя сутки после начала реакции.

Использование гипохлорита натрия в качестве реагента для химической деструкции метронидазола привело к разрушению его нативной структуры на 93,39 % на 7-е сутки после старта реакции, экспозиция реакционной смеси до 30 суток не приводила к более

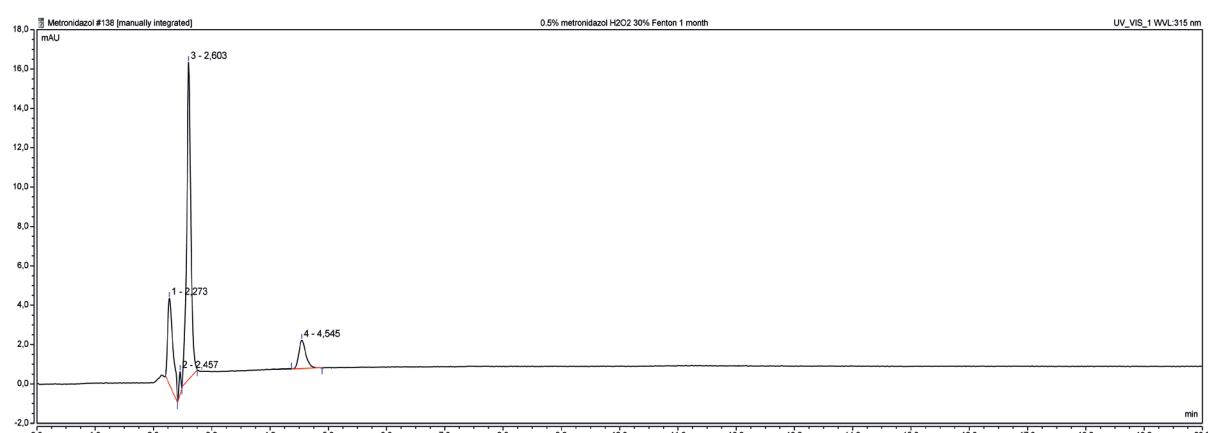


Рис. 6. Хроматограмма продуктов деструкции метронидазола, образовавшихся при его окислении реагентом Фентона

глубокому протеканию процессов разрушения молекулы метронидазола (рис. 8).

Заключение. Исследование методом высокоэффективной жидкостной хроматографии показало, что не приводит к существенному разрушению структуры метронидазола гидролиз без добавления реагентов, гидролиз в растворе кислоты хлористоводородной разведенной, гидрокарбоната натрия, кислоты лимонной при всех температурных режимах, а также окисление пероксидом водорода в нейтральной и слабокислой среде и окисление персульфатом калия без нагревания.

Показано, что в качестве перспективных способов химической деструкции метронидазола могут быть использованы гидролиз раствором гидроксида натрия, разведенного при комнатной температуре, окисление пероксидом водорода 3 %-го в слабощелочной среде, персульфатом калия при нагревании реакционной смеси до в течение часа при температуре 60 °C, персульфата калия в присутствии сульфата железа (II), а также окисление реагентом Фентона. Использование пероксида во-

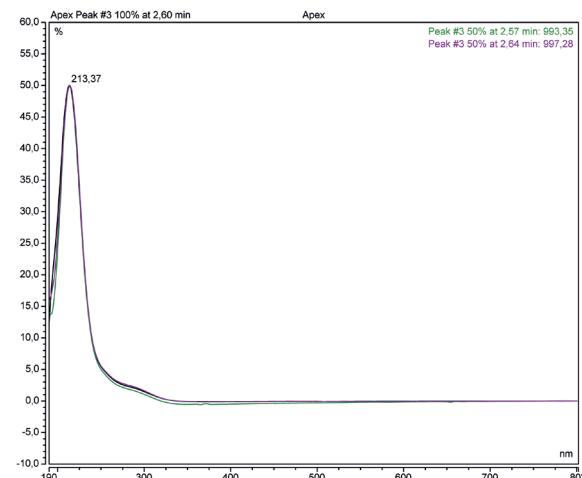


Рис. 7. Спектр поглощения основного продукта деструкции метронидазола реагентом Фентона

дорода 30 %-го в слабощелочной среде, а также гипохлорита натрия приводит к неполному разрушению нативной структуры метронидазола, что, ввиду наличия более эффективных подходов к химической деструкции, указывает на нерациональность их применения.

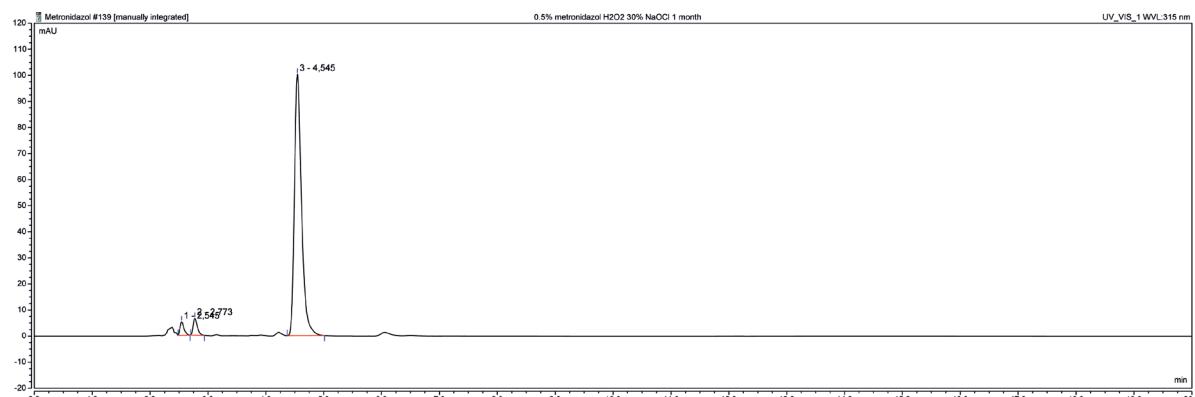


Рис. 8. Хроматограмма продуктов деструкции метронидазола, образовавшихся при его окислении гипохлоритом натрия

Список цитированных источников

1. Фармацевтические соединения на основе азотсодержащих гетероциклов – новый класс загрязнителей окружающей среды (обзор) / А.Н. Мухутдинова, М.И. Рычкова, Е.А. Тюмина, Е.В. Вихарева // Вест. Пермск. ун-та. Серия: Биология. – 2015. – № 1. – С. 65–76.
2. Pharmaceuticals and their metabolites in the marine environment: sources, analytical methods and occurrence / L.M. Madikizela [et al.] // Trends in Environmental Analytical Chemistry. – 2020. – V. 28. – P. 1–79.
3. Klampfl, C.W. Metabolization of pharmaceuticals by plants after uptake from water and soil: a review / C.W. Klampfl // Trends in Analytical Chemistry. – 2019. – V. 111. – P. 13–26.
4. Шестопалов, А.Е. Метронидазол в антибактериальной терапии гнойно–септических заболеваний в абдоминальной хирургии / А.Е. Шестопалов, А.В. Бутров, А.Ю. Борисов // Русский медицинский журнал. – 2007. – Т. 1. – № 1. – С. 61–68.
5. Кочеровец, В.И. Актуальные вопросы теории и практики применения топических препаратов метронидазола в дерматологии / В.И. Кочеровец // Антибиотики и химиотерапия. – 2019. – Т. 64. – № 7–8. – С. 38–43.



6. Пашанова, О.В. Эффективность комбинаций лекарственных препаратов в эрадикационной терапии язвенной болезни желудка, ассоциированной с *Helicobacter pylori* / О. В. Пашанова // Вест. новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2023. – Т. 17. – № 2. – С. 7–20. – DOI 10.24412/2075-4094-2023-2-1-1.

14. Государственная фармакопея Республики Беларусь: (ГФ Республики Беларусь II): разработана на основе Европейской Фармакопеи. В 2 т. Т. 2. Контроль качества субстанций для фармацевтического использования и лекарственного растительного сырья / М-во здравоохр. Респ. Беларусь, УП «Центр экспертизы и испытаний в здравоохранении»; под общ. ред. С.И. Марченко. – Молодечно: Типография «Победа», 2016. – С 679–680.

USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY
IN CONTROLLING THE PROCESSES OF CHEMICAL DESTRUCTION
OF 5-NITROIMIDAZOLE DERIVATIVES USING METRONIDAZOLE

Mikhailava N.I., Lukashov R.I.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

This study investigates the chemical degradation of 5-nitroimidazole derivatives using metronidazole as a model compound. High-performance liquid chromatography (HPLC) was employed to assess the efficiency of hydrolysis and oxidation under various conditions. The most effective methods for degrading the native structure of metronidazole were alkaline hydrolysis with diluted sodium hydroxide at room temperature, oxidation with 3 % hydrogen peroxide in a mildly alkaline medium, Fenton's reagent, and potassium persulfate in the presence of iron(II) sulfate. Some methods, such as oxidation with 30 % hydrogen peroxide and sodium hypochlorite, resulted in incomplete degradation. The findings highlight promising approaches for reducing pharmaceutical residues in the environment

Keywords: metronidazole; 5-nitroimidazole; chemical destruction; high-performance liquid chromatography; Fenton reagent; oxidation; hydrolysis.