INSTITUTE OF APPLIED MECHANICS, RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES,
MOSCOW, RUSSIA

UDC 579 872: 579 222.2, LBC 28.072

03 – life sciences

BIODEGRADATION OF PRIMAQUINE AND THE PROBLEM OF ITS BIOSAFETY

Sc. D. I. A. Parshikov

Abstract. After using primaquine in medicine and veterinary medicine, it is not decomposed completely at municipal wastewater treatment plants and therefore is discharged into the environment. We studied changes in the structure of primaquin by the fungus *Beauveria bassiana*, which is widespread in nature. High performance liquid chromatography (HPLC) showed the presence of two metabolites. Spectra of proton nuclear magnetic resonance and mass spectra of metabolites showed the formation of *N*-acetyl primaquine and *N*-formyl primaquine.

Keywords: biodegradation, acetylation, formylation, *Beauveria bassiana*

ИНСТИТУТ ПРИКЛАДНОЙ МЕХАНИКИ РАН, МОСКВА, РОССИЯ

УДК 579 872: 579 222.2, ББК 28.072

03 – биологические науки

БИОДЕГРАДАЦИЯ ПРИМАХИНА И ПРОБЛЕМА ЕГО БИОБЕЗОПАСНОСТИ

Доктор биологических наук И. А. Паршиков

Реферат. После использования в медицине и ветеринарии примахин полностью не разлагается на муниципальных очистных сооружениях и, следовательно, сбрасывается в окружающую среду. Мы изучили изменения структуры примахина грибом *Beauveria bassiana*, широко распространенным в природе. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) показала присутствие двух метаболитов. Спектры протонного ядерного магнитного резонанса и масс-спектры метаболитов показали образование *N*-ацетилпримахина и *N*-формилпримахина.

Ключевые слова: биотрансформация, ацетилирование, формилирование, *Beauveria bassiana*

Введение

Примахин (8-аминохинолин) применяется для лечения малярии [1, 2, 5, 8] уже более 50 лет. В последнее время примахин используется для лечения рака [4].

Примахин, попавший в стоки после лечения людей и животных, не полностью удаляется на очистных сооружениях и, следовательно, попадает в окружающую среду [6], что представляет опасность для животного и растительного мира. Органические отходы могут превращаться в новые и более стойкие соединения, которые сбрасываются в природные источники в дополнение к исходному веществу.

Многие исследования были посвящены биотрансформации примахина для изучения путей превращения этого препарата в организме животных и микробах.

В организме человека и животных, а также в клетках микроорганизмов образуются различные метаболиты примахина, самым распространенным является карбоксипримахин [7]. Другим распространенным метаболитом примахина является *N*-ацетилпримахин [7]. Этот метаболит синтезируется практически всеми видами *Streptomyces*. Другими возможными процессами превращения примахина в живых организмах являются деалкилирование, образование *N*-гидроксидропроизводных, 5- и 6-гидроксипроизводных, а также 6-метокси-8-гидроксиаминохинолина и прочие [11].

Мы исследовали биотрансформацию примахина грибом *Beauveria bassiana*. Этот гриб широко распространен в природе и был способен преобразовывать многие органические соединения [10]. Таким об-

разом, этот гриб может быть использован в качестве модели для биodeградации примихина в сточных водах.

Материалы и методы исследования

Гриб *Beauveria bassiana* ATCC 7159 был получен из Американской коллекции типовых культур и поддерживался на агаровых косяках [9]. Мицелий ресуспендировали с поверхности агара в 5 мл стерилизованной воды и использовали для инокуляции колб емкостью 500 мл. Каждая колба содержала 100 мл среды, содержащей (г/л): сахара – 30,0; пептон – 5,0; NaCl – 3,0; NaNO₃ – 3,0; KH₂PO₄ – 5,0; MgSO₄·7H₂O – 0,5; KCl – 0,5; FeSO₄ – 0,1; MnSO₄ – 0,001, вода водопроводная, pH 5,0. Культуры выращивали в течение 48 часов на на круговой качалке (180 оборотов в минуту) при 28°C [9].

Примихин был приобретен у компании Sigma Chemical Co. Вещество растворяли в дистиллированной воде и добавляли 1 мл в каждую колбу так, что конечная концентрация вещества составляла 100 мг/л. После этого культуры были инкубированы еще 10 дней на качалке при температуре 28°C.

После проведения процесса трансформации биомассу отделяли фильтрацией через бумажный фильтр на воронке Бюхнера. Фильтрат упаривали на роторном вакуумном испарителе при 50°C до 0,1 объема и экстрагировали тремя равными объемами хлористого метилена (при pH 10 – 11) в делительной воронке (экстрагировать можно и неупаренный фильтрат). Экстракт упаривали в вакууме досуха и использовали для выделения продуктов трансформации.

Экстракт был исследован с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на жидкостном хроматографе Waters 2690 (Waters, США), оснащенном Waters 996 UV-фотодиодным детектором при длине волны 265 нм, с использованием колонки Phenomenex (США) Prodigy 5 мкм ODS-3 (4,6 x 10 мм). Компонентами подвижной фазы являлись растворитель А (0,7 % раствор триэтиламина в воде, pH 7,5) и растворитель Б (метанол). Подвижной фазой служил 50-минутный линейный градиент от 45 % до 80 % растворителя В. Скорость потока 0,2 мл в мин. Относительная концентрация продуктов трансформации была рассчитана по площади пика на хроматограмме при 265 нм. Продукты биodeградации выделяли с помощью препаративной обращенно-

фазовой ВЭЖХ с использованием хроматографа Waters Delta Prep 4000, снабженного полупрепаративной колонкой (10 x 250 мм) Phenomenex (США) Prodigy 5 мкм ODS-3 (скорость потока = 2,5 мл/мин).

После выделения продуктов, они были высушены под вакуумом на роторном испарителе и использованы для дальнейшего анализа.

Жидкостную хроматографию/масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением (ЖХ-МС-ЭРИ) проводили с помощью системы ВЭЖХ Hewlett-Packard 1090L/М и квадрупольного масс-спектрометра Hewlett-Packard 5989В. Вещества разделяли используя колонку Phenomenex Prodigy ODS-3 (2,0 x 250 мм). Подвижная фаза имела 40-минутный линейный градиент от 5 % ацетонитрила/95 % воды до 95 % ацетонитрила/5 % воды с содержанием 0,1 % муравьиной кислоты. Скорость потока 0,2 мл/мин.

Спектры протонного магнитного резонанса ¹H ЯМР снимались на приборе Bruker AM 500 NMR (Bruker, США), вещества растворялись в дейтерированном диметилсульфоксиде.

Результаты исследования и их обсуждение

ВЭЖХ анализ экстракта инкубационной жидкости гриба *B. bassiana* показал три пика: остаточного примихина, время удерживания 28,4 мин, и двух метаболитов (П-1 и П-2), время удерживания 22,6 и 44,3 мин соответственно. Другие пики были обнаружены, но они присутствовали и в контрольных образцах. Через 10 дней инкубации, как было показано площадью пика при 265 нм, осталось 72,7 % внесенного в колбы примихина.

Метаболит П-1 имел 2,8 % от общей площади всех пиков при 265 нм (УФ-спектр $\lambda_{\text{max}} = 267, 301 \text{ и } 384 \text{ нм}$). Масс-спектр положительных ионов ЭРИ, полученный при +200 В, продукта П-1 состоял из ионов с m/z 288 (5) [M + H]⁺, 271 (12) [M + H – NH₃]⁺ и 203 (100) [M + H – C₅H₁₀NH₂]⁺. Согласно полученным данным, наиболее вероятным является образование *N*-формилпримихина (рис. 1). Потеря боковой цепи от протонированной молекулы *N*-формилпримихина является причиной образования иона при m/z 203. ¹H ЯМР-спектр метаболита П-1 показан в таблице 1.

Метаболит П-2 имел 24,5 % от общей

Таблица 1

Параметры ^1H ЯМР для примахина и его метаболитов, продуцируемых грибом *B. bassiana* ATCC 7159

Протон	Химический сдвиг, ppm ^a			Константы расщепления, J (Hz)		
	Примахин	П-1	П-2	Примахин	П-1	П-2
H2	8.53	8.54	8.52	$J_{2,3} = 4.3,$ $J_{2,4} = 1.7$	$J_{2,3} = 4.3,$ $J_{2,4} = 1.7$	$J_{2,3} = 4.1,$ $J_{2,4} = 1.7$
H3	7.42	7.43	7.41	$J_{3,4} = 8.4$	$J_{3,4} = 8.4$	$J_{3,4} = 8.4$
H4	8.07	8.08	8.06			
H5	6.47	6.47	6.46	$J_{5,7} = 2.6$	$J_{5,7} = 2.6$	$J_{5,7} = 2.6$
H6	3.81	3.81	3.81			
H7	6.28	6.30	6.24			
H8	6.14		6.10	$J_{8,9} = 8.6$		$J_{8,9} = 8.8$
H9	3.65	3.71	3.61			
H10	1.21	1.23	1.19	$J_{9,10} = 6.5$	$J_{9,10} = 6.5$	$J_{9,10} = 6.4$
H11	1.58-1.70	1.58-1.70	1.43- 1.53, 1.64			
H12	1.58-1.70	1.58-1.70	1.43- 1.53, 1.64			
H13	2.76	2.75	3.03	$J_{12,13} = 7.3$	$J_{12,13} = 7.3$	$J_{12,13} = 7.3$
H14			7.78			
H15			1.76			
H16		8.10				

^a Пробы были растворены в дейтерированном диметилсульфоксиде.

площади всех пиков при 265 нм (УФ-спектр $\lambda_{\text{max}} = 265$ и 362 нм). Масс-спектр положительных ионов ЭРИ, полученный при +200 В, продукта П-2 состоял из ионов с m/z 302 (5) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 175 (100) $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_5\text{H}_{10}\text{NH}_2\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$ и 132 (9) $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_2\text{H}_3\text{OC}_5\text{H}_{10}\text{NH}_2\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$. Потеря боковой цепи от протонированной молекулы метаболита П-2 является причиной образования иона при 175, который идентичен базовому пику для исходного материала. ^1H ЯМР-спектр метаболита П-1 показан в таблице 1. Полученное вещество было идентифицировано как *N*-ацетилпримахин (рис. 1).

Примахин является важным противомалярийным и противоопухолевым средством [4] и долгое время используется в медицине. В отличие от других 8-аминохинолинов, терапия примахином успешно устраняет спорозоиты, мерозоиты и гаметы, находящиеся вне инфицированных эритроцитов. Наиболее распространенные пути превращения примахина различными организмами изучались в разных лабораториях.

К сожалению, 8-гидроксиаминохинолины, образующиеся в организме человека из примахина и его производных, обладают гемолитической активностью [3]. Было проведено большое количество ис-

следований, касающихся модификации структуры примахина микроорганизмами [7] и изучено множество микробных процессов, таких как алкилирование и ацетилирование группы первичного амина, образование карбоксипримахина, гидроксिलирование ароматического кольца и др. Получение тех или иных производных из примахина не исключало образования 8-гидроксиаминохинолинов при их попадании в организм человека [7, 3].

Образование *N*-формилированных или *N*-ацетилированных производных в положении 8 молекулы примахина (рис. 1) может помочь избежать образования 8-гидроксиаминохинолинов в окружающей среде и организме человека.

Нами установлено, что процесс биodeградации примахина грибом *B. bassiana* приводит к образованию *N*-формилированного производного в группе вторичного амина и *N*-ацетилированного производного в группе первичного амина боковой цепи молекулы (рис. 1). Из огромного количества микроорганизмов, присутствующих в окружающей среде, грибок *B. bassiana* моделирует только одну возможность изменения структуры примахина из множества других возможных способов его биodeградации.

Примахин **N-формилпримахин (П-1)** **N-ацетилпримахин (П-2)****Рис. 1.** Структуры примахина и его метаболитов**ПРИМЕЧАНИЯ**

1. Паршиков И. А., Зарайский Е. И. Биопревращения потенциально противоопухолевых фторхинолонов // Российский научный журнал. 2018. № 2(59). С. 167-171.

2. Паршиков И. А. Синтез биобезопасных гидроксипроизводных потенциально противоопухолевого препарата артемизинина базидиальными грибами // Российский научный журнал. 2018. № 3(60). С. 151-155.

3. Bolchoz L. J., Budinsky R. A., McMillan D. C., Jollow D. J. Primaquine-induced hemolytic anemia: formation and hemotoxicity of the arylhydroxylamine metabolite 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001. V. 297. N 2. P. 509-515.
4. Choi A. R., Kim J. H., Woo Y. H., Kim H. S., Yoon S. Drugs primaquine and chloroquine have different sensitization effects with anti-mitotic drugs in resistant cancer cells // *Anticancer Res.* 2016. V. 36. N 4. P. 1641-1648.
5. Graves P. M., Choi L., Gelband H., Garner P. Primaquine or other 8-aminoquinolines for reducing *Plasmodium falciparum* transmission // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2018. N 2: CD008152.
6. Heberer T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data // *Toxicol. Lett.* 2002. V. 131. N 1-2. P. 5-17.
7. Hufford C. D., Clark A. M., Quinones I. N., Baker J. K., McChesney J. D. Microbial metabolism studies on the major microbial and mammalian metabolite of primaquine // *J. Pharm. Sci.* 1983. V. 72. N 1. P. 92-94.
8. Parshikov I. A., Hernandez-Luna C. E., Zarskiy E. I. Microbial transformation of the antimalarial and anticancer drug artemisinin by white-rot basidiomycetes // *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences.* 2018. V. 20. N 4. P. 1093-1096.
9. Parshikov I. A., Khasaeva F. M. Fungal transformation of ofloxacin and enrofloxacin // *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences.* 2018. V. 20. N 2. P. 368-371.
10. Parshikov I. A., Heinze T. M., Williams A. J., Moody J. D., Freeman J. P., Sutherland J. B. Biotransformation of the antibacterial agent cinoxacin by the fungus *Beauveria bassiana* // *FEMS Microbiol. Lett.* 2002. V. 214. P. 133-136.
11. Vale N., Moreira R., Gomes P. Primaquine revisited six decades after its discovery // *Eur. J. Med. Chem.* 2009. V. 44. N 3. P. 937-953.

REFERENCES

1. Parshikov I. A., Zarskiy E. I. Bioconversions of Potentially Anti-Tumor Fluoroquinolones // *Russian Scientific Journal.* 2018. № 2(59). C.167-171.
2. Parshikov I. A. Synthesis of Biosafe Hydroxy Derivatives of the Potentially Antitumor Drug Artemisinin by Basidiomycetes // *Russian Scientific Journal.* 2018. № 3(60). C.151-155.
3. Bolchoz L. J., Budinsky R. A., McMillan D. C., Jollow D. J. Primaquine-induced hemolytic anemia: formation and hemotoxicity of the arylhydroxylamine metabolite 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001. V. 297. N 2. P. 509-515.
4. Choi A. R., Kim J. H., Woo Y. H., Kim H. S., Yoon S. Drugs primaquine and chloroquine have different sensitization effects with anti-mitotic drugs in resistant cancer cells // *Anticancer Res.* 2016. V. 36. N 4. P. 1641-1648.
5. Graves P. M., Choi L., Gelband H., Garner P. Primaquine or other 8-aminoquinolines for reducing *Plasmodium falciparum* transmission // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2018. N 2: CD008152.
6. Heberer T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data // *Toxicol. Lett.* 2002. V. 131. N 1-2. P. 5-17.
7. Hufford C. D., Clark A. M., Quinones I. N., Baker J. K., McChesney J. D. Microbial metabolism studies on the major microbial and mammalian metabolite of primaquine // *J. Pharm. Sci.* 1983. V. 72. N 1. P. 92-94.
8. Parshikov I. A., Hernandez-Luna C. E., Zarskiy E. I. Microbial transformation of the antimalarial and anticancer drug artemisinin by white-rot basidiomycetes // *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences.* 2018. V. 20. N 4. P. 1093-1096.
9. Parshikov I. A., Khasaeva F. M. Fungal transformation of ofloxacin and enrofloxacin // *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences.* 2018. V. 20. N 2. P. 368-371.
10. Parshikov I. A., Heinze T. M., Williams A. J., Moody J. D., Freeman J. P., Sutherland J. B. Biotransformation of the antibacterial agent cinoxacin by the fungus *Beauveria bassiana* // *FEMS Microbiol. Lett.* 2002. V. 214. P. 133-136.
11. Vale N., Moreira R., Gomes P. Primaquine revisited six decades after its discovery // *Eur. J. Med. Chem.* 2009. V. 44. N 3. P. 937-953.