

## ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АКСАМОНА

Е. П. Дурицын, Г. И. Шведов, Т. Н. Илюшина

*Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко*

Поступила в редакцию 18.10.2009 г.

**Аннотация.** Определены оптимальные условия изолирования аксамона из биологического материала 0,1 М раствором серной кислоты. Для идентификации и количественного определения аксамона в извлечениях из биологического материала (печень) предложен метод тонкослойной хроматографии и УФ-спектрофотометрия.

**Ключевые слова:** аксамон, изолирование, настаивание, тонкослойная хроматография, УФ-спектрофотометрия.

**Abstract.** Optimal conditions have been determined for axamone isolation from biomaterial by solution of sulfuric acid 0,1 M. Thin-layer chromatography and UV-spectrophotometric methods are proposed for identification and quantitative determination of axamone in extract from biomaterial of liver.

**Keywords:** axamone, isolation, infusion, thin-layer chromatography, UV-spectrophotometry.

### ВВЕДЕНИЕ

Антихолинэстеразные средства обратимого действия применяются, как правило, при патологических состояниях, сопровождающихся дефицитом периферической холинергической иннервации [1]. Недостатком антихолинэстеразных средств является быстрое привыкание, что требует значительного увеличения дозы. Было отмечено, что однократное или многократное введение больших доз антихолинэстеразных препаратов не только не улучшает состояние больных, а, наоборот, ухудшает; часто развивается холинергический криз и больные погибают от асфиксии. Поэтому современные антихолинэстеразные средства вследствие нерационального их применения могут явиться причиной острых отравлений [2].

Вопрос о том, имело ли место отравление обратимым антихолинэстеразным веществом, должен решаться в ходе судебно-химического исследования [3].

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Обнаружить и определить количественное содержание токсикологически важных веществ непосредственно в биологическом материале очень сложно. Поэтому в химико-токсикологическом анализе (ХТА) исследуемые вещества вначале выделяют из объектов, а затем производят идентификацию и количественное определение выделенных веществ [4].

Ткани органов являются лучшими объектами для получения результатов, сопоставимых с резуль-

татами анализа крови. Анализ тканей в ряде случаев может быть более удобен и достоверен, чем анализ биожидкостей, даже для одного и того же обнаруживаемого соединения.

Результаты ХТА в значительной степени зависят и от выбора методов изолирования. При использовании неправильно выбранного метода может быть частичная или полная потеря исследуемых веществ.

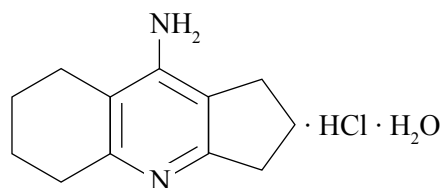
Степень изолирования исследуемых веществ из биоматериала зависит от структуры биоматериала, проникающей способности экстрагента, степени измельчения биологического материала, кратности настаивания биологического материала с экстрагентом, pH среды и ряда других факторов.

В настоящее время большинство методик, используемых для выделения азотистых токсичных соединений, основано на методе, разработанном В. Ф. Крамаренко, и заключается в том, что токсичные соединения изолируются из биоматериала подкисленной водой.

Для обнаружения токсичных веществ, выделенных из биоматериала, в ХТА используется ряд физических и физико-химических методов, таких как метод хроматографии в тонких слоях сорбентов (ТСХ), спектроскопии в УФ-области и др.

### ЭКСПЕРИМЕНТ

В качестве объекта исследования был рассмотрен препарат «Аксамон» (Axamon), МНН — Ипидакрин (Ipidacrine) (номер регистрации: ГР: № 003550/01, 28.06.2004 от ПИК-ФАРМА (Россия), производитель ПИК-ФАРМА (Россия) [5, 6]:



Измерили оптическую плотность 0,0016% раствора при длине волны 230—300 нм с шагом 2 нм на спектрофотометре СФ-46 в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм. Раствор сравнения — вода очищенная.

Для построения градуировочного графика 0,1 г препарата внесли в колбу на 100 мл, размешали, довели до метки водой очищенной, перемешали. Полученный раствор профильтровали через бумажный фильтр «белая лента». Из фильтрата взяли 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 мл раствора, внесли в колбы вместимостью 50 мл, довели водой очищенной до метки, перемешали. Измерили оптическую плотность полученных растворов при длине волны 270 нм на спектрофотометре СФ-46 в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм. Раствор сравнения — вода очищенная.

Для выделения лекарственного вещества из смеси веществ изучили его подвижность при хроматографировании на пластинах «Сорбфил» UV-254. Процесс хроматографирования осуществляли в стеклянных камерах внутренним объемом около 600 см<sup>3</sup>. Камеры предварительно насыщались парами подвижной фазы в течение 60 минут. Температура воздуха и атмосферное давление при хроматографировании соответствовали нормальным условиям.

Неподвижной фазой являлся гидроксированный сорбент (силикагель СТХ-1 ВЭ в виде тонкого слоя на стандартных пластинах «Сорбфил» UV-254). В состав тонкого слоя, кроме силикагеля, входят связующее вещество силиказоль и люминесцентный индикатор. Размеры пластин — 10×10 см.

В качестве возможных подвижных фаз рассмотрены гидрофобные и гидрофильные органические растворители различной полярности, а также системы растворителей.

Для проведения эксперимента около 50 мг (точная навеска) препарата растворяли в 25 мл воды очищенной. Полученный раствор наносили на линию старта хроматографической пластины микрошприцем «Газохром». Пластины высушивали на воздухе и хроматографировали восходящим методом на стандартных пластинах «Сорбфил» UV-254, длина пробега растворителя со-

ставляла 8 см. После завершения процесса хроматографирования пластину вынимали из хроматографической камеры, высушивали и проявляли в УФ-свете. Рассчитывали значения коэффициента подвижности  $R_f$ .

В процессе исследования изучали особенности извлечения аксамона из биологического материала (печень) изолирующими агентами различной химической природы: этилацетат, тетрагидрофуран, спирт этиловый, вода дистиллированная, 0,1 М раствор серной кислоты, 2 % раствор сульфата аммония.

Модельные смеси (5 г мелкоизмельченной ткани печени, содержащей определенное количество исследуемого вещества) выдерживали при температуре 18—22° С в течение 1,5 часов после их приготовления. Каждую модельную смесь заливали 10 мл изолирующего агента и настаивали в течение 45 минут. Полученные извлечения сливали. Модельные смеси вновь заливали 10 мл изолирующего агента и настаивали в течение 45 минут. Полученные извлечения объединяли и фильтровали через бумажный фильтр белая лента.

Часть извлечения (0,15 мл) наносили на пластину «Сорбфил» UV-254. В качестве подвижной фазы использовали систему растворителей спирт этиловый : уксусная кислота = 7 : 3. После завершения процесса хроматографирования пластину вынимали из хроматографической камеры, высушивали и проявляли в УФ-свете.

На полученных хроматограммах в УФ-свете наблюдали пятно аксамона темно-фиолетового цвета. Анализируемое вещество идентифицировали по величине коэффициента подвижности  $R_f$ , совпадающей с таковой вещества-свидетеля, и по максимуму на спектре поглощения.

Пятно аксамона вырезали из хроматограммы вместе с участком пластины, помещали в пробирку и элюировали вещество из сорбента 10 мл воды очищенной в течение 15 минут. Оптическую плотность полученного элюата измеряли при длине волны 270 нм на спектрофотометре СФ-46 в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм. Измерения проводили на фоне раствора, полученного в контрольном опыте. По величине оптической плотности определяли количество аксамона, изолированного из биологического материала, используя при этом уравнение градуировочного графика  $y = 0,058 \cdot 10^4 \cdot x$ .

Далее в процессе исследования изучали зависимость степени извлечения аксамона от кратности настаивания модельной смеси и объема изолирующего агента.

В качестве изолирующей жидкости использовали 0,1 М раствор серной кислоты. Модельную смесь настаивали с 5, 10, 15 и 20 мл этого изолирующего агента в течение 30 минут. Извлечения сливали. После чего модельную смесь вновь заливали соответствующим количеством изолирующего агента и настаивали в течение 30 минут и т.д. Таким образом получили по четыре извлечения от каждой модельной смеси.

Полученные извлечения фильтровали через бумажный фильтр белая лента. Количественное содержание препарата определяли по методике, изложенной выше.

Затем изучали зависимость степени извлечения аксамона от продолжительности контакта изолирующей жидкости и биоматериала.

В качестве изолирующего агента использовали 0,1 М раствор серной кислоты. Каждую модельную смесь дважды настаивали с этим изолирующим агентом в течение 15, 30, 45, 60, 75 минут.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Максимальное поглощение 0,0016% раствора аксамона наблюдали при длине волны 270 нм (рис. 1).

Длина волны 270 нм была выбрана в качестве аналитической длины волны для построения графика зависимости оптической плотности водных растворов аксамона от концентрации.

По результатам измерений оптической плотности водных растворов аксамона различной концентрации построили градуировочный график (рис. 2).

Линейная зависимость оптической плотности раствора от концентрации препарата в интервале

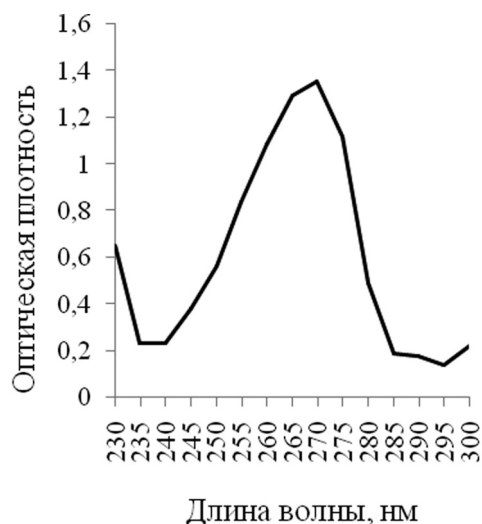


Рис. 1. Зависимость оптической плотности 0,016% раствора аксамона от длины волны

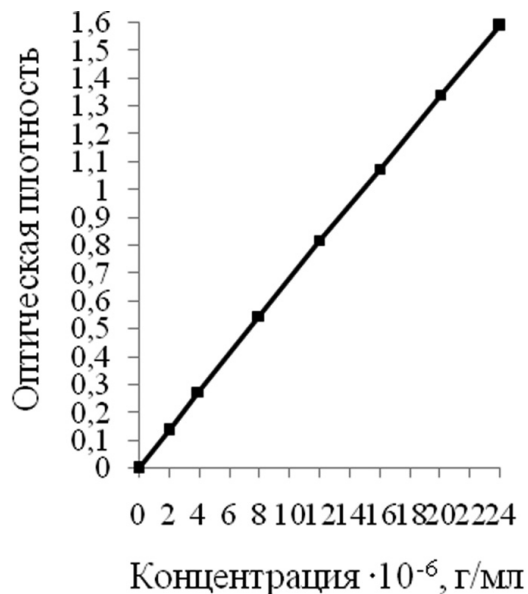


Рис. 2. Градуировочный график

концентраций от  $1 \times 10^{-6}$  до  $2,2 \times 10^{-5}$  г/мл свидетельствует о том, что в этой области концентраций выполняется закон Бугера-Ламберта-Бееера и построенный график может быть использован для количественного определения аксамона [7].

Результаты хроматографирования аксамона в индивидуальных подвижных фазах и различных смесях растворителей представлены в табл. 1.

Как свидетельствуют полученные данные, наименьшая хроматографическая подвижность исследуемых соединений наблюдается при использовании в качестве подвижной фазы хлороформа, диоксана, эфира диэтилового, толуола, этилацетата, являющимися неполярными или малополярными растворителями. Кроме того, низкую подвижность аксамона можно объяснить плохой растворимостью вещества в этих растворителях.

При переходе к растворителям, обладающими более кислыми свойствами, наблюдается заметный рост хроматографической активности. По результатам исследования в качестве подвижной фазы для хроматографирования аксамона была выбрана система спирт этиловый : уксусная кислота = 7 : 3.

Результаты изучения изолирования аксамона из биологического материала различными изолирующими агентами представлены в табл. 2.

Как свидетельствуют полученные данные (табл. 2), наиболее полное изолирование препарата удалось осуществить при использовании в качестве изолирующего агента 0,1 М раствора серной кислоты.

При исследовании зависимости степени извлечения аксамона от кратности настаивания мо-

Таблица 1  
Подвижность аксамона при хроматографировании  
на пластинках «Сорбфил» UV-254

№ п/п	Растворитель	$R_f$
1	Спирт этиловый	0,06
2	Хлороформ	0,00
3	Диоксан	0,00
4	н-Бутанол	0,04
5	Уксусная кислота	0,08
6	Эфир диэтиловый	0,00
7	Ацетон	0,04
8	Толуол	0,00
9	Этилацетат	0,00
10	Тетрагидрофуран	0,09
11	Спирт этиловый : тетрагидрофуран : ацетон = 3:6:1	0,19
12	Спирт этиловый : тетрагидрофуран : ацетон = 6:3:1	0,18
13	Тетрагидрофуран : ацетон = 3:7	0,18
14	Тетрагидрофуран : ацетон = 7:3	0,15
15	Спирт этиловый : уксусная кислота = 3:7	0,38
16	Спирт этиловый : уксусная кислота = 7:3	0,39
17	Спирт этиловый : ацетон = 3:7	0,08
18	Спирт этиловый : ацетон = 7:3	0,20

дельной смеси и объёма изолирующего агента были получены следующие данные, представленные в табл. 3.

Как свидетельствуют полученные данные (табл. 3), для достижения достаточно полного изолирования аксамона необходимо трёхкратное настаивание биологического материала с изолирующим агентом при условии, что количество изолирующего агента в каждом случае должно превышать количество биологического материала как минимум в 2 раза.

При исследовании зависимости степени извлечения аксамона от продолжительности контакта изолирующего агента и биоматериала были получены следующие данные, представленные в табл. 4.

Как свидетельствуют полученные данные (табл. 4), наиболее полное изолирование препарата удалось осуществить при контакте изолирующего агента с модельной смесью в течение 75 мин при двукратном настаивании.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного исследования разработана методика изолирования аксамона из биологического материала и его количественного определения:

1. Изолирующий агент для выделения аксамона из биологического материала 0,1 М раствор серной кислоты;

2. Двукратное настаивание биологического материала с изолирующим агентом при условии, что количество изолирующего агента в каждом случае должно превышать количество биологического материала как минимум в 2 раза;

3. Продолжительность контакта изолирующего агента с модельной смесью 75 мин.

Таблица 2  
Зависимость степени изолирования аксамона от природы изолирующего агента  
(экстрагент — вода очищенная)

№ пластины	Изолирующий агент	Содержание аксамона в навеске, мг	Найдено	
			мг	%
1	Этилацетат	10,00	Не обнаружен	
2	Тетрагидрофуран	10,00	Не обнаружен	
3	Этанол	10,00	Не обнаружен	
4	Вода очищенная	10,00	Не обнаружен	
5	0,1 М раствор серной кислоты	10,00	5,33	53,33
6	2% раствор сульфата аммония	10,00	4,00	40,00

Таблица 3

*Зависимость степени извлечения аксамона от кратности настаивания модельной смеси и объема изолирующего агента (экстрагент — вода очищенная)*

Навеска биоматериала, г	Содержание аксамона в навеске, мг	Количество изолирующего агента, г	Порядковый номер настаивания	Найдено	
				мг	%
5,00	10,00	5,00	1	0,97	9,71
		5,00	2	1,07	10,75
		5,00	1+2	2,04	20,46
		5,00	3	1,17	11,72
		5,00	1+2+3	3,21	32,18
		5,00	4	1,24	12,41
			1+2+3+4	4,45	44,60
5,00	10,00	10,00	1	1,74	17,47
		10,00	2	1,80	18,05
		10,00	1+2	3,55	35,52
		10,00	3	2,05	20,57
		10,00	1+2+3	5,61	56,11
		10,00	4	1,44	14,48
			1+2+3+4	7,05	70,57
5,00	10,00	15,00	1	2,44	24,48
		15,00	2	2,68	26,90
		15,00	1+2	5,13	51,38
		15,00	3	2,55	25,52
		15,00	1+2+3	7,68	76,90
		15,00	4	2,27	22,76
			1+2+3+4	9,96	99,65
5,00	10,00	20,00	1	2,85	28,51
		20,00	2	4,55	45,52
		20,00	1+2	7,40	74,02
		20,00	3	2,50	25,06
		20,00	1+2+3	9,90	99,08
		20,00	4	0,00	00,00
			1+2+3+4	9,90	99,08

Таблица 4

*Зависимость степени извлечения аксамона от продолжительности контакта изолирующего агента и биоматериала (экстрагент — вода очищенная)*

Навеска биоматериала, г	Содержание аксамона в навеске, мг	Продолжительность контакта изолирующей жидкости и биоматериала, мин	Найдено	
			мг	%
5,00	10,00	15	5,06	50,66
5,00	10,00	30	5,20	52,00
5,00	10,00	45	5,33	53,33
5,00	10,00	60	7,33	73,33
5,00	10,00	75	9,73	97,33

4. Количественное содержание выделенного аксамона определяется методом УФ-спектрофотометрии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Машковский М. Д.* Лекарственные средства / М. Д. Машковский. — М.: Новая волна, 2005. — 1200 с.

2. *Скрипниченко Д. Ф.* Диагностика и лечение миастении / Д. Ф. Скрипниченко, М. М. Шевнюк. — Киев: Здоровье, 1991. — 152 с.

3. *Смусин Я. С.* Судебно-медицинская экспертиза отравлений антихолинэстеразными веществами / Я. С. Смусин. — М.: Медицина, 1968. — 192 с.

4. *Крамаренко В. Ф.* Токсикологическая химия / В. Ф. Крамаренко. — Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1989. — 447 с.

5. Инструкция по медицинскому применению препарата «Аксамон», утвержденная Приказом Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития от 2.06.06 № 42 изм-Пр-рег./06.

6. Фармакопейная статья предприятия ООО «Экохим-инновации» 42-0104399103.

7. *Харитонов Ю. Я.* Аналитическая химия (аналитика). Количественный анализ. Физико-химические (инструментальные) методы анализа. — М.: Высш. шк., 2003. — 559 с.

---

*Дурицын Евгений Петрович* — доцент кафедры фармацевтической химии и клинической фармации Воронежской государственной медицинской академии; тел.: (4732) 530-249

*Шведов Григорий Иванович* — доцент кафедры фармацевтической химии и клинической фармации Воронежской государственной медицинской академии

*Илюшина Татьяна Николаевна* — ассистент кафедры фармацевтической химии и клинической фармации Воронежской государственной медицинской академии; e-mail: ilyushina\_t@mail.ru

*Duritsin Evgeniy P.* — assistant professor of pharm. chemistry department, Voronezh State Medical Academy; tel.: (4732) 530-249

*Shvedov Grigoriy I.* — assistant professor of pharm. chemistry department, Voronezh State Medical Academy,

*Ilyushina Tatiana N.* — assistant professor of pharm. chemistry department, Voronezh State Medical Academy, e-mail: ilyushina\_t@mail.ru