

ОСОБЕННОСТИ ИЗОЛИРОВАНИЯ ПРОЗЕРИНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

В. К. Шорманов, Д. В. Астафьев, М. И. Алёхина

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»

Поступила в редакцию 24.06.2016 г.

Аннотация. В качестве изолирующего агента для извлечения прозерина из биологического материала предложен ацетон. Показана возможность очистки анализируемого соединения от соэкстрактивных веществ биоматериала на колонке, заполненной обращённофазовым сорбентом «Сила-сорб» С-18 30 мкм. Определены оптимальные условия изолирования прозерина из биологического материала ацетоном. Для идентификации и количественного определения прозерина в очищенных извлечениях из ткани печени предложены методы ТСХ и спектрофотометрии в видимой области спектра, а также хромогенная реакция получения аци-нитропроизводного.

Ключевые слова: прозерин, изолирование, биологический материал, очистка, идентификация и количественное определение.

Abstract. Acetone was proposed as the insulating agent for proserine extracting from biological material. The possibility of purification of the analyte from the co-extracted substances of biological material on a column packed with reverted-phase sorbent "Silasorb" C-18 30 micrometers was shown. Optimal conditions of proserine isolating from the biological material with acetone were determined. Methods of TLC and spectrophotometry in the visible spectrum and the chromogenic reaction of producing the aci-nitro derivatives were offered for the identification and quantification of proserine in purified extracts of liver tissue.

Keywords: proserine, isolation, biological material, purification, identification and quantification.

Прозерин или неостигмина метилсульфат (химическое название 3-[[диметиламино]карбонил(окси)]-N,N,N-триметилбензаммония метилсульфат) – лекарственное средство, которое обладает выраженной антихолинэстеразной активностью, способствует накоплению и усилению действия ацетилхолина на ткани и органы, а также восстановлению нервно-мышечной проводимости [1, 2], вследствие чего широко применяется в медицинской практике для лечения миастении, паралича, ряда глазных заболеваний, невритов, атонии желудочно-кишечного тракта и мочевого пузыря [3, 4].

Прозерин также добавляют к местным анестетикам, чтобы продлить обезболивающее действие [5].

Известны попытки применения прозерина в качестве противоядия при отравлении тетродотоксином [6].

Молекулярная масса прозерина 334.39. По физическим свойствам рассматриваемое соединение – это белые кристаллы горького вкуса без запаха

с температурой плавления 145°C, очень легко растворимые в воде (1:10), легко – в хлороформе и этаноле (1:5), очень мало – в диэтиловом эфире. На свету приобретают розовый оттенок [7].

Прозерин обладает высокой токсичностью для теплокровных животных и человека. LD₅₀ для мышей при внутрижелудочном введении составляет 7.5-14 мг/кг, при внутривенном – 0.16-0.40 мг/кг. LD₅₀ для крыс при внутривенном введении составляет 0.25 мг/кг, при подкожном – 0.70 мг/кг.

В литературных источниках приводятся случаи отравления людей прозеринном различной степени тяжести, в том числе с летальным исходом [9, 10].

Имеются данные, согласно которым летальная доза прозерина для человека при пероральном введении составляет 60 мг/кг [8].

Высокая токсичность, широкое применение рассматриваемого соединения в различных отраслях медицины, наличие случаев летального отравления делают его важным объектом судебно-химического исследования.

Отдельные вопросы судебно-химического анализа прозерина, а именно особенности изолирования из биологического материала, остаются недостаточно изученными.

Целью работы явилось изучение особенностей изолирования прозерина из биологического материала.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования явился прозерин (неостигмина метилсульфат), соответствующий требованиям ГФХ, с содержанием основного вещества не менее 99,0%.

Изучали особенности изолирования прозерина из биологического материала растворителями различной химической природы: водой и водными растворами кислой и щелочной реакции, а также гидрофильными и гидрофобными органическими жидкостями, применявшимися ранее при химико-токсикологических исследованиях других органических соединений [11, 12].

Для этого готовили модельные смеси прозерина (размер частиц 5-50 мкм) и мелкоизмельченной (размер частиц 0.2-0.5 см) ткани печени с содержанием 25 мг вещества в 25 г биологического материала, которые выдерживали при 18-22°C в течение 1 часа после их приготовления. Осуществляли двукратное изолирование прозерина при соотношении изолирующего агента и биологического материала 2:1 (по массе). Продолжительность каждого настаивания составляла 45 минут. Оба извлечения, полученные из каждой модельной смеси, объединяли в выпарительной чашке, испаряли до сухого остатка в токе воздуха при температуре 18-22°C, остаток растворяли в 5 мл ацетона. Часть объединенного извлечения (0.2-0.6 мл) наносили на пластины типа «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ, обработанные вазелиновым маслом (модель фазы с привитыми алкильными радикалами $C_{14} - C_{15}$), и хроматографировали, используя подвижную фазу ацетон-буфер рН=1,98 в соотношении 2:8 по объёму в присутствии вещества-свидетеля. На хроматограммах прозерин обнаруживался в виде розового пятна на более светлом общем фоне пластины в УФ-свете. Значение R_f составляло 0.34 ± 0.02 . Пятно анализируемого вещества вместе с участком подложки вырезали из хроматограммы, помещали в градуированную пробирку и элюировали вещество из сорбента 5 мл этанола. Этанольный элюат отделяли в выпарительную чашку и испаряли растворитель в токе воздуха при 18-22°C до получения сухого остатка.

Сухой остаток обрабатывали 0.5 мл 10% раствора нитрата калия в концентрированной (93-94%) серной кислоте в течение 7 минут. По прошествии этого времени в реакционную смесь осторожно добавляли 1 мл воды, 3-4 мл 10% раствора гидроксида натрия, количественно переносили раствор в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводя объём её содержимого до метки 10% раствором гидроксида натрия. Исследуемое вещество идентифицировали по особенностям поглощения получаемого раствора аци-нитропроизводного в УФ- и видимой частях спектра. По величине оптической плотности фотометрируемого раствора, измеренной в области 377 нм (спектрофотометр СФ-56, длина оптического пути 10 мм), определяли количество прозерина спектрофотометрическим методом, используя уравнение градуировочного графика.

С помощью описанной выше схемы изолирования, очистки и определения прозерина исследовали зависимость величины степени извлечения рассматриваемого соединения из биологического материала от продолжительности контакта изолирующей жидкости с биологическим материалом, кратности настаивания и количественного соотношения изолирующего агента и биологической ткани.

Изучены особенности очистки рассматриваемого вещества методом колоночной хроматографии. Остаток, полученный после испарения изолирующего агента из объединенного извлечения, растворяли в 2 мл подвижной фазы вода-ацетон (9.5:0.5), вносили данный раствор в колонку размером 490×10 мм, заполненную 7.5 г сорбента «Силасорб С-18» 30 мкм. Хроматографировали, собирая элюат фракциями по 2 мл. Прозерин обнаруживали во фракциях методом ТСХ (пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ, обработанные вазелиновым маслом (модель привитой фазы $C_{14} - C_{15}$; подвижная фаза буферный раствор с рН 1.98 – ацетон (8:2); наносимый на пластину объём каждой фракции - 5 мкл).

В найденных оптимальных условиях проводили контрольное хроматографирование на колонке извлечения из 25 г ткани печени, заведомо не содержащей прозерина. Фракции элюата, в которых теоретически возможно присутствие анализируемого вещества, объединяли, испаряли и растворяли остаток в 10 мл ацетона. 2.5 мл полученного раствора вносили в выпарительную чашку и испаряли растворитель в токе воздуха. Остаток обрабатывали 0.5 мл 10% раствора нитрата калия в сер-

ной кислоте ($\rho=1.83 \text{ г/см}^3$), прибавляли 1 мл воды, 8.5 мл 10 % раствора гидроксида натрия и измеряли оптическую плотность раствора при 377 нм (условия количественного определения прозерина).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты изолирования прозерина из трупной печени различными растворителями представлены на рис. 1.

Сравнение результатов изолирования показало, что наибольшая степень извлечения достигается при использовании в качестве изолирующего агента ацетона.

Преимущества ацетона как изолирующего агента можно объяснить тем, что он хорошо растворяет анализируемое соединение, обладает способностью проникать через клеточные оболочки биологических тканей, частично разрушая их, смешивается с межклеточной жидкостью и жидкой основой внутриклеточного содержимого, нарушает лабильные связи молекул анализита с активными участками молекул биологических тканей, осаждает эндогенные белковые структуры.

Для предложенной цветной реакции образования аци-нитросоли линейная зависимость оптической плотности окрашенного раствора от формального содержания прозерина в фото-

метрируемом растворе наблюдалась в интервале концентраций 1-30 мкг/мл. Градуировочный график имел вид: $A = 0.031035 \times C + 0.008728$, где A - оптическая плотность; C - концентрация, мкг/мл. Коэффициент корреляции составил > 0.99 .

При определении прозерина в субстанции методом спектрофотометрии на основе получения аци-нитропроизводного относительная ошибка среднего результата не превышала 1.4 %.

Используя разработанную цветную реакцию, установлено, что максимальная степень извлечения прозерина из трупной печени ацетоном достигается при продолжительности настаивания 45 минут (рис. 2).

Исследование зависимости степени извлечения прозерина от кратности настаивания (табл. 1) показало, что для достаточно полного извлечения рассматриваемого вещества из трупной печени необходимо двукратное настаивание биологического материала с изолирующим агентом при условии, что количество изолирующего агента (ацетона) в каждом случае должно превышать количество биологического материала как минимум в 2 раза по массе.

В процессе идентификации методом УФ-спектрофотометрии сравнение спектральных кривых аци-нитропроизводного прозерина, извлечённого из биоматериала и очищенного по вы-

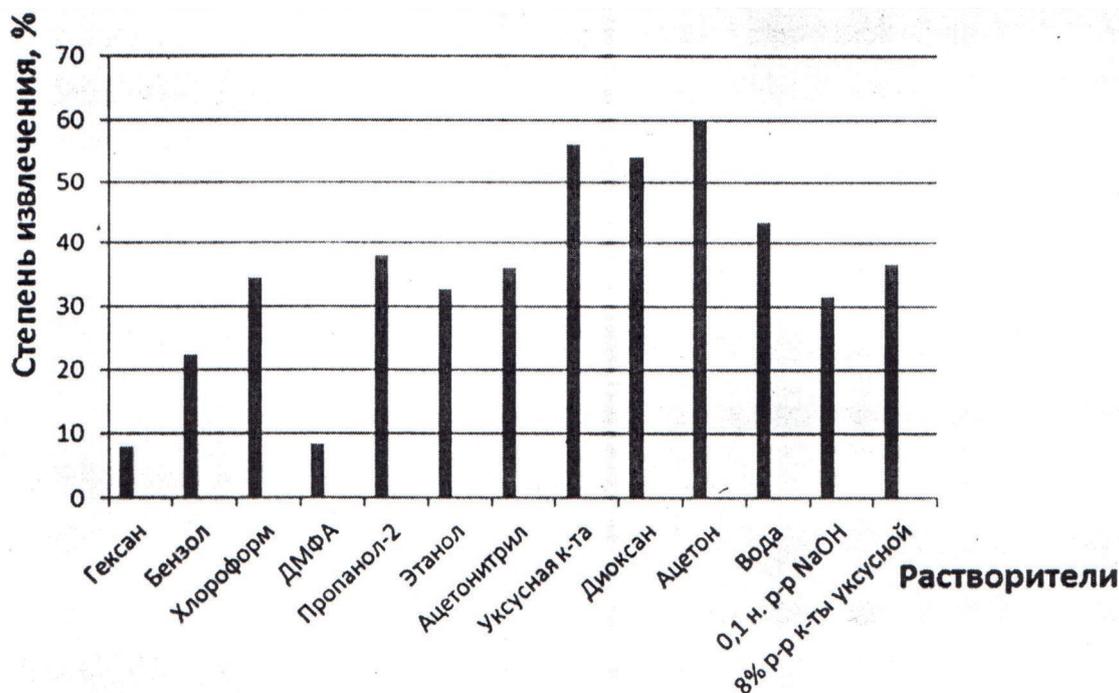


Рис. 1. Зависимость степени извлечения (R, %) прозерина из ткани печени от природы изолирующего агента (двукратное изолирование, соотношение «изолирующий агент – биоматериал» 2:1 (по массе))

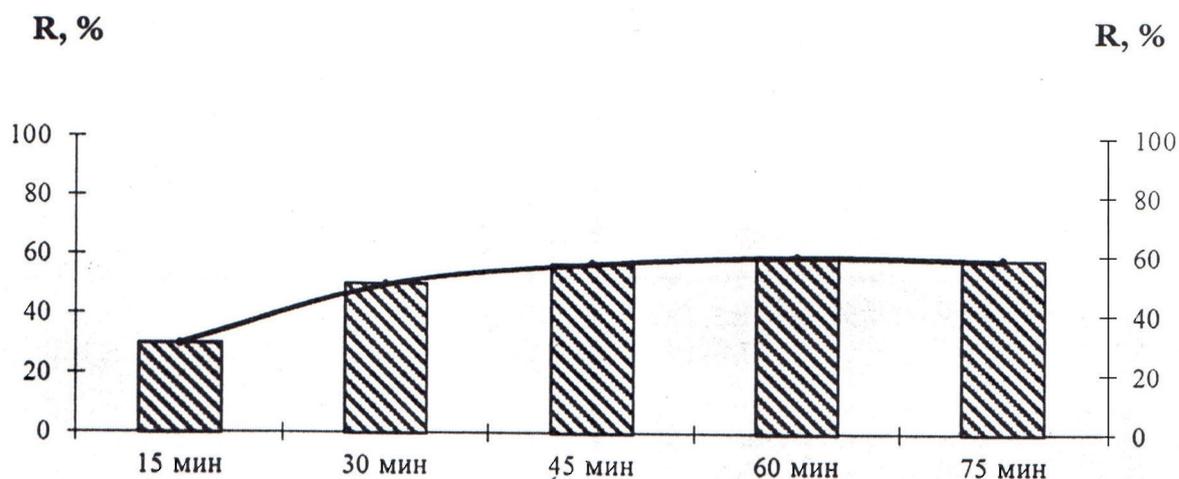


Рис. 2. Зависимость степени извлечения (R, %) прозерина из ткани печени от продолжительности настаивания с ацетоном (двукратное изолирование, соотношение ацетона и биоматериала 2:1 (по массе))

Таблица 1

Зависимость степени извлечения прозерина из ткани печени от соотношения количеств биоматериала и ацетона и кратности настаивания (n=5)

Взято вещества, мг	Масса биоматериала, г	Масса ацетона, г	Кратность настаивания	Найдено вещества	
				мг	%
25	25	25	1	7.65	30.62
			2	3.78	15.13
			1+2	11.43	45.75
			3	2.87	11.50
			1+2+3	14.3	57.25
			4	1.58	6.32
25	25	50	1+2+3+4	15.88	63.57
			1	9.79	39.15
			2	4.51	18.04
			1+2	14.3	57.19
			3	1.86	7.46
			1+2+3	16.16	64.65
25	25	62,5	4	0.89	3.55
			1+2+3+4	17.05	68.10
			1	10.45	41.78
			2	4.21	16.83
			1+2	14.66	58.61
			3	1.68	6.71
25	25	75	1+2+3	16.34	65.32
			4	0.73	2.92
			1+2+3+4	17.07	68.24
			1	11.12	44.49
			2	4.01	16.02
			1+2	15.13	60.51
25	25	100	3	1.57	6.29
			1+2+3	16.7	66.80
			4	0.58	2.31
			1+2+3+4	17.28	69.11
			1	12.09	48.35
			2	3.86	15.43
25	25	100	1+2	15.95	63.78
			3	1.42	5.67
			1+2+3	17.37	69.45
			4	0.23	0.93
			1+2+3+4	17.6	70.15

шеописанной схеме, со спектром аци-нитропроизводного стандарта прозерина в этаноле (рис. 3) обнаруживалось совпадение формы спектральной кривой и положения точек максимумов в области 232 ± 4 нм, 275 ± 2 нм и 377 ± 2 нм.

Как свидетельствуют полученные данные, на тонкослойной хроматограмме прозерина, выделенного из биологического материала, при сравнении её с хроматограммой вещества-стандарта не обнаруживается присутствие выраженных пятен эндогенных веществ биологической матрицы и заметное искажение формы пятна аналита. При этом параметры хроматографирования анализируемого соединения, выделенного из ткани трупной печени, совпадают с соответствующими параметрами стандартного вещества.

Изучение хроматографической подвижности прозерина в колонке сорбента «Силасорб С-18» 30 мкм показало, что в качестве элюента целесообразно использование смеси вода-ацетон (95:5). В этом случае анализируемое вещество присутствует в 4 - 6 фракциях элюата (7-12 мл).

На основе результатов предварительных исследований предложена методика определения прозерина в биологическом материале.

Методика определения прозерина в биологическом материале

Изолирование. В каждом случае 25.00 г мелкоизмельченной ткани печени, содержащей определенное количество прозерина (от 2.50 до 50.00 мг), заливали 50 г ацетона и выдерживали в течение 45 минут при периодическом перемешивании. Извлечение сливали, а процесс настаивания повторяли по описанной выше схеме. Отдельные извлечения объединяли в фарфоровой чашке и упаривали в токе воздуха при $18-22^{\circ}\text{C}$ до сухого остатка.

Очистка методом колоночной хроматографии. Сухой остаток растворяли в 2-3 мл смеси вода-ацетон (95:5) раствор вводили в стеклянную колонку размером 490 x 11 мм, заполненную 7.5 г сорбента «Силасорб С-18» 30 мкм. Элюировали смесью вода-ацетон (95:5). Элюат собирали фракциями по 2 мл каждая. Фракции с 4 по 6 включительно объединяли, испаряли в токе воздуха при температуре $18-22^{\circ}\text{C}$.

Остаток растворяли в 3-4 мл ацетона, количественно переносили раствор в мерную колбу вместимостью 5 мл и доводили до метки ацетоном («исходный ацетоновый раствор»). В две выпарительные чашки (№ 1 и № 2) вносили 0.5-2.5 мл исходного ацетонового раствора и испаряли растворитель, получая сухие остатки.

Идентификация методом ТСХ. Остатки в чашках № 1 и № 2 растворяли (каждый) в незначи-

Оптическая плотность,

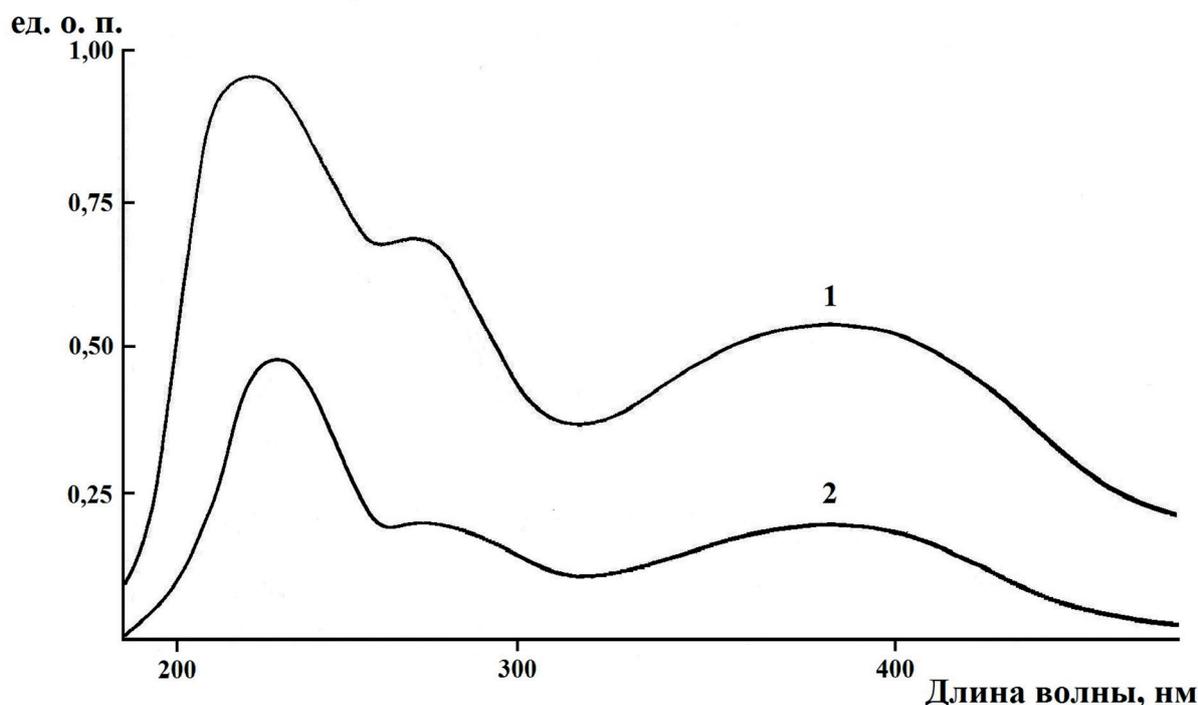


Рис. 3. Спектральные кривые растворов аци-нитропроизводного прозерина в водно-щелочной среде: 1 – раствор, полученный на основе вещества, изолированного из ткани печени; 2 – раствор, соответствующий условному содержанию стандарта прозерина 0.003%

тельном объеме ацетона. Каждый образующийся раствор количественно наносили в виде полос на линии старта отдельной пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ, обработанной вазелиновым маслом (модель привитой фазы $C_{14} - C_{15}$. Хроматографировали в стеклянной камере, используя подвижную фазу буферный раствор с pH 1.98 – ацетон (8:2), в присутствии вещества-свидетеля. Анализируемое вещество на каждой хроматограмме идентифицировали по величине R_f , которая составляла 0.34 ± 0.02 .

Идентификация методом УФ-спектрофотометрии. После предварительного хроматографирования методом ТСХ по вышеуказанной схеме участок из хроматограммы № 1 с анализируемым веществом вырезали и элюировали вещество 5 мл этанола. Поглощение элюата исследовали на спектрофотометре СФ-56 в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм (раствор сравнения – этанол). Соединение идентифицировали по форме спектральной кривой и положению максимумов поглощения 215 ± 2 нм и 265 ± 1 нм.

Идентификация и количественное определение методом спектрофотометрии на основе реакции получения аци-нитропроизводного. После предварительного хроматографирования методом ТСХ по вышеуказанной схеме участок из хроматограммы № 2 с анализируемым веществом вырезали и элюировали вещество дважды порциями этанола по 5 мл каждая. Элюаты объединяли в выпарительной чашке и испаряли растворитель в токе воздуха при температуре $18-22$ °С до получения сухого остатка. Остаток обрабатывали 0,5 мл 10% раствора нитрата калия в концентрированной (93-94%) серной кислоты в течение 7 минут. По прошествии этого времени в реакционную смесь осторожно добавляли 1 мл воды, 3-4 мл 10% раствора гидроксида натрия, количественно перенесли раствор в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводя объём её содержимого до метки 10%

раствором гидроксида натрия. Исследуемое вещество идентифицировали по особенностям поглощения получаемого раствора аци-нитропроизводного в УФ- и видимой частях спектра (максимумы поглощения при 232 ± 4 нм, 275 ± 2 нм и 377 ± 2 нм). По величине оптической плотности фотометрируемого раствора, измеренной в области 377 нм (спектрофотометр СФ-56, длина оптического пути 10 мм), определяли количество прозерина спектрофотометрическим методом, используя уравнение градуировочного графика.

Как свидетельствуют данные эксперимента, представленные в табл. 2, увеличение содержания прозерина в модельных смесях в достаточно широком интервале концентраций (2.50 – 50.00 мг) при постоянной массе навески ткани печени (25.00 г) сопровождается лишь незначительным изменением значений степени извлечения, не превышающим 2 %.

Использование в качестве изолирующего агента ацетона, предложенные условия изолирования и очистки позволяют достичь достаточно высокой степени извлечения анализируемого вещества из ткани печени трупов (54.25-56.16%). Открываемый минимум составляет $3 \cdot 10^{-4}$ г прозерина в 100 г биологического материала. Предложенная методика достаточно хорошо воспроизводима, отличается простотой выполнения, точностью, необходимой для целей судебно-химического анализа, не требует применения сложной аппаратуры и значительных затрат времени на воспроизведение. Она может быть использована в практике при проведении экспертизы в случае отравления прозеринном.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обоснована целесообразность использования ацетона в качестве изолирующего агента при химико-токсикологическом исследовании прозерина.

Определены оптимальные условия изолирования рассматриваемого соедине-

Таблица 2

Зависимость степени извлечения (R, %) прозерина из ткани печени от количества прозерина и биологического материала (по массе) (n = 5; P = 0.95)

Внесено прозерина, мг в 25 г биоматериала	Найдено, %				
	\bar{X}	S	S_x	$\Delta\bar{X}$	$S_r, \%$
2.5	54.25	3.599	1.61	4.47	6.63
5.0	55.19	3.197	1.43	3.98	5.79
10.0	55.88	2.75	1.23	3.41	4.92
25.0	55.09	2.571	1.15	3.19	4.67
50.0	56.16	2.527	1.13	3.13	4.49

ния ацетоном из биологического материала и очистки получаемых извлечений в колонке сорбента «Силасорб С-18» 30 мкм.

Показана возможность идентификации и количественной оценки содержания прозерина в модельных смесях с тканью печени после его изолирования ацетоном и очистки по предлагаемой схеме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sato, T. Anticholinesterases; peripheral and central effects / T. Sato, H. Nakatsuka // Masui. — 2013. — Vol. 62, N 1. — P. 19-26.
2. Flow-through enzyme immobilized amperometric detector for the rapid screening of acetylcholinesterase inhibitors by flow injection analysis / M. Vandeput [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. — 2015. — Vol. 102. — P. 267-275.
3. Beneficial effect of crotamine in the treatment of myasthenic rats / S. Hernandez-Oliveira-e-Silva [et al.] // Muscle Nerve. — 2013. — Vol. 47, N 4. — P. 591-593.
4. Use of neostigmine in apocitinib-induced paralytic ileus / G. Mak // Tumori. — 2013. — Vol. 99, N 5. — P. 225-228.
5. Akinwale, M.O. Analgesic effect of intrathecal neostigmine combined with bupivacaine and fentanyl / M.O. Akinwale, P.T. Sotunmbi, O.A. Akinyemi // Afr. J. Med. Sci. — 2012. — Vol. 41, N 2. — P. 231-237.
6. Liu, S.H. Is neostigmine effective in severe pufferfish-associated tetrodotoxin poisoning? / S.H. Liu, C.Y. Tseng, C.C. Lin // Clin. Toxicol. (Phila). — 2015. — Vol. 53, N 1. — P. 13-21.
7. Справочник лекарств РЛС®. Неостигмина метилсульфат (Neostigmine methylsulfate): инструкция, применение и формула. Доступно по: http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2433.htm. Ссылка активна на 22.06.2016.
8. Прозоровский, В.Б. Неантхолинэстеразные механизмы действия антихолинэстеразных средств / В.Б. Прозоровский, Н.В. Саватеев. — Л.: Медицина, 1976. — 160 с.
9. Муравьева, Г.М. Обнаружение мапротиллина и прозерина при судебно-химическом исследовании трупного материала / Г.М. Муравьева // Судебно-медицинская экспертиза. — 2005. — Т. 48, № 2. — С. 42-43.
10. Рубцов, А.Ф. Смертельные отравления в 1970-1971 годах / А.Ф. Рубцов // Судебно-медицинская экспертиза. — 1974. — Т. 17, № 4. — С. 36-39.
11. Шорманов, В.К. Особенности определения 4-нитро-3-(трифторметил)-анилина в биологическом материале / В.К. Шорманов, Ю.В. Андреева, В.А. Омельченко // Судебно-медицинская экспертиза. — 2016. — Т. 59, № 3. — С. 31-37.
12. Особенности определения 2-гидроксибензойной кислоты в биологическом материале / В.К. Шорманов [и др.] // Фармация. — 2016. — Т. 65, № 2. — С. 3-8.

ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский университет

Шорманов В. К., доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии,

E-mail: r-wladimir@yandex.ru.

Тел.: 8 (4712) 58-13-23

Астафьев Д. В., студент 5 курса фармацевтического факультета.

E-mail: dmitr.astafjew@yandex.ru

Тел.: 8 (4712) 58-13-23

Алёхина М. И., заочный аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии

GBOU VPO «Kursk State Medical University»

Shormanov V. K., Doctor of Pharmacy, professor of the department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry,

E-mail: r-wladimir@yandex.ru.

Ph.: 8-(4712)-58-13-23

E-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru.

Astafjev D. V., 5th year student of the Faculty of Pharmacy.

E-mail: dmitr.astafjew@yandex.ru

Phone №.: 8-(4712)-58-13-23

Alekhina M. I., post-graduate student of the department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry