



УДК: 615.074:547.575

ИЗОЛИРОВАНИЕ ХЛОРАМБУЦИЛА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

В.К. ШОРМАНОВ
М.Л. СТОЛЯРОВ

*Курский государственный
медицинский университет*

e-mail: r-wladimir@yandex.ru

В качестве изолирующего агента для извлечения хлорамбуцила из биологического материала предложен ацетон. Определены оптимальные условия изолирования хлорамбуцила из ткани печени трупа человека ацетоном и дана количественная оценка результатов изолирования.

Ключевые слова: хлорамбуцил, изолирование, судебно-химический анализ, ТСХ, спектрофотометрия.

Хлорамбуцил (4-[пара-[бис-(β-хлорэтил)-амино]фенил]масляная кислота) – это противоопухолевое лекарственное средство из группы производных бис-(β-хлорэтил)-амина. Он является основным действующим веществом препаратов Лейкеран, Clokeran, Leukeran и др. Его фармакологические эффекты широко используются при лечении различных онкологических заболеваний (лимфолейкоз, лимфогранулематоз, лимфо- и ретикулосаркома, рак яичников и молочной железы, миеломная болезнь и др.). Также хлорамбуцил может применяться в качестве иммуносупрессанта [2].

По физическим свойствам хлорамбуцил представляет собой белый кристаллический или зернистый порошок, хорошо растворимый в этаноле, ацетоне, хлороформе, эфире и практически нерастворимый в воде.

Хлорамбуцил обладает значительной токсичностью для теплокровных организмов. LD₅₀ для крыс при внутрибрюшинном введении составляет 21-23 мг/кг. Пероральное введение дозы 40 мг/кг/сут вызывает гибель 50% крыс в эксперименте [4].

В доступной литературе встречается описание случаев отравления людей хлорамбуцилом. Он является канцерогеном, может вызывать развитие вторичных злокачественных опухолей. Нарушение функций жизненно важных органов вследствие приема препарата может привести к летальному исходу [1, 5].

Широкое применение хлорамбуцила в качестве лекарственного средства, его токсичность и наличие случаев отравления обуславливают необходимость изучения этого соединения в химико-токсикологическом отношении.

Вопросы химико-токсикологического анализа данного вещества изучены недостаточно. Существующие методики изолирования и определения хлорамбуцила и близких по структуре соединений в биологическом материале обладают недостаточно высокой экспрессностью и селективностью, отличаются трудоемкостью и сложностью применяемой аппаратуры [3].

Цель. Изучение изолирования хлорамбуцила из биологического материала изолирующими агентами различной природы и подбор оптимальных условий изолирования (объема изолирующего агента, времени и кратности настаивания).

Материалы и методы исследования. Объектом исследования явилась субстанция хлорамбуцила фирмы «Sigma-Aldrich» с содержанием основного вещества не менее 99,5 %.

Изучали особенности изолирования хлорамбуцила из биологического материала растворителями различной химической природы: водой и водными растворами кислот и щелочей (0,1 н. раствор гидроксида натрия, 8% раствор уксусной кислоты), карбоновыми кислотами (ледяная уксусная кислота) и их ангидридами (уксусный ангидрид), кетонами (ацетон), спиртами (метанол, этанол, пропанол-1, пропанол-2, бутанол-1, бутанол-2), гетероциклическими кислородсодержащими соединениями (диоксан), алканами (гексан), галогеналканами (метилхлорид, хлороформ, тетрахлорметан), а также аренами (бензол, толуол, о-ксилол), сложными и простыми эфирами (диэтиловый эфир, метилацетат, этилацетат, пропилацетат, бутилацетат), нитрилами (ацетонитрил).

Для этого готовили модельные смеси исследуемого вещества и мелкоизмельченной трупной печени человека, которые выдерживали при 18–20 °С в течение 1,5 часов после приготовления. Осуществляли двукратное изолирование хлорамбуцила из модельных смесей 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, отфильтровывали на фильтре, предварительно промытом изолирующим агентом, а затем очищали от соэкстрактивных веществ биологической матрицы мето-



дом адсорбционной высокоэффективной ТСХ, используя тонкий слой гидроксированного сорбента СТХ-1А и подвижную фазу гексан-диоксан-пропанол-2 в объемных соотношениях 12,5:5:1. На хроматограммах хлорамбуцил обнаруживался в виде темно-фиолетового пятна на более светлом общем фоне пластины в УФ-свете. Хлорамбуцил элюировали из сорбента этилацетатом двукратно порциями по 5 мл. Элюат испаряли в токе воздуха при комнатной температуре, а анализируемое вещество, содержащееся в остатке, переводили в соответствующее нитропроизводное путем обработки 10% раствором калия нитрата в концентрированной серной кислоте в течение 5 минут.

Количество хлорамбуцила в извлечениях определяли по интенсивности поглощения его нитропроизводного в среде разбавленного раствора гидроксида натрия при аналитической длине волны 325 нм. Расчеты осуществляли по уравнению градуировочного графика.

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

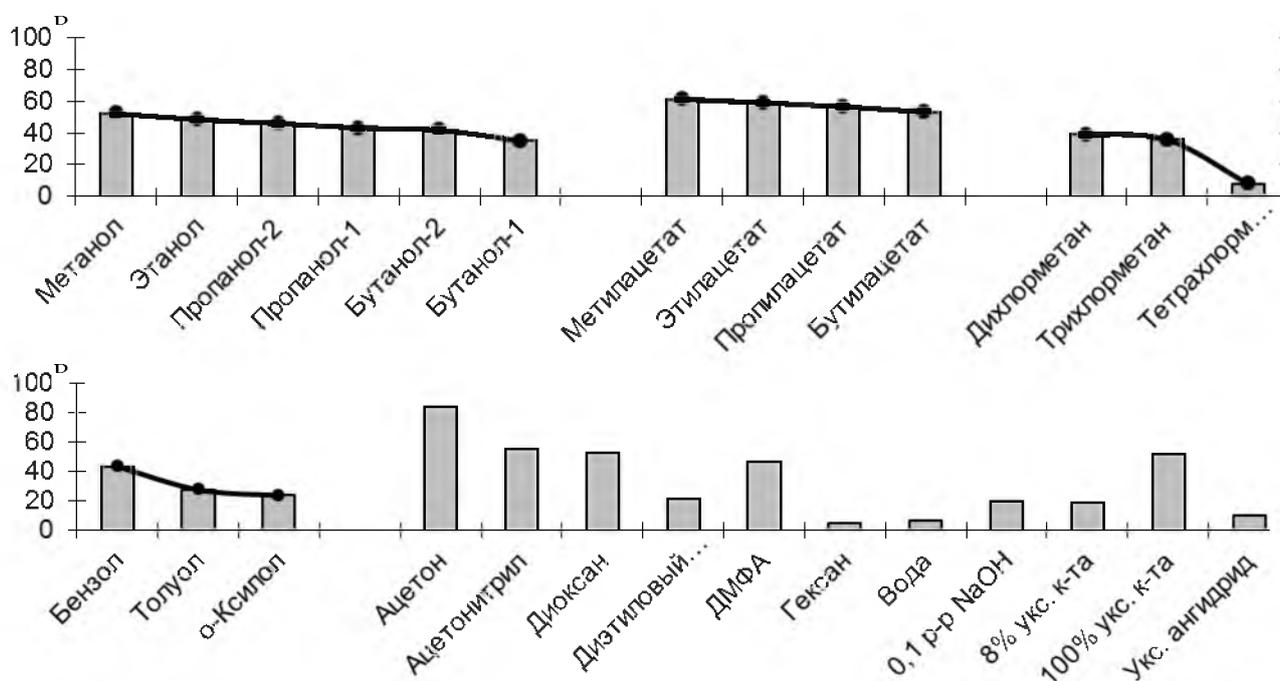


Рис. 1. Зависимость степени извлечения (R, %) хлорамбуцила из ткани печени от природы изолирующего агента (двукратное изолирование, соотношение изолирующего агента и биологического материала 2:1 (по массе))

Изучалась зависимость степени извлечения хлорамбуцила оптимальным изолирующим агентом в оптимальных условиях от концентрации анализируемого соединения в биологическом объекте. В каждом случае 25,00 г мелкоизмельченной трупной печени человека, содержащей определенное количество хлорамбуцила (от 2,50 до 50,00 мг), заливали 50 г ацетона и выдерживали в течение 30 минут при периодическом перемешивании. По истечении 30 минут извлечение сливали с твердого остатка, а процесс настаивания повторяли по описанной выше схеме. Отдельные извлечения объединяли и отфильтровывали на фильтре, предварительно промытом ацетоном. 0,5 мл полученного фильтрата наносили на хроматографическую пластину «Сорбфил» марки ПТСХ-АФ-А-УФ в виде полосы и осуществляли хроматографирование в присутствии вещества-свидетеля в стеклянной камере объемом 600 см³, используя в качестве элюента систему растворителей гексан-диоксан-пропанол-2 (12,5:5:1). Участок хроматограммы с хлорамбуцилом вырезали и осуществляли элюирование анализируемого вещества с пластины этилацетатом дважды порциями по 5 мл. Элюат испаряли в токе воздуха при комнатной температуре, а сухой остаток переводили в соответствующее нитропроизводное по описанной выше схеме. Оптическую плотность нитропроизводного измеряли на спектрофотометре СФ-56 в кварцевых кюветках с толщиной рабочего слоя 10 мм при аналитической длине волны, равной



325 нм. В качестве фона использовали элюат, полученный в контрольном опыте. Количественное содержание рассматриваемого вещества рассчитывали с помощью уравнения градуировочного графика.

Результаты исследования и их обсуждение. В данном случае уравнение градуировочного графика имело вид:

$$A = 0,01562 \cdot C + 0,004535,$$

где А – оптическая плотность; С – концентрация, мкг/мл;

Результаты зависимости изолирования хлорамбуцила из трупной печени от природы изолирующего агента представлены на рис. 1.

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

Установлено, что максимальная степень извлечения хлорамбуцила из трупной печени ацетоном достигается при продолжительности настаивания не менее 30 минут (рис. 2).

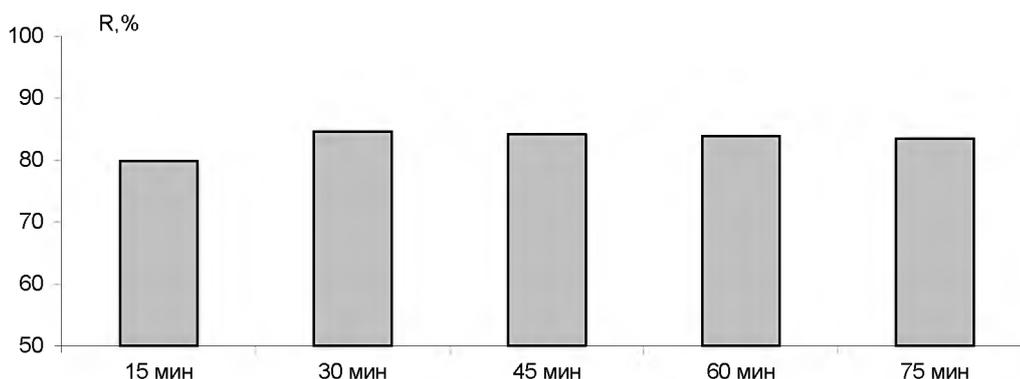


Рис. 2. Зависимость степени извлечения (R, %) хлорамбуцила из ткани печени от времени (двукратное изолирование ацетоном, соотношение изолирующего агента и биологического материала 2:1 (по массе))

Таблица 1

Зависимость степени извлечения (R, %) хлорамбуцила из ткани печени от соотношения количества биоматериала и ацетона и от кратности настаивания (n=5)

Взято вещества, мг	Масса ацетона, г	Кратность настаивания	Найдено вещества	
			мг	%
1	2	3	4	5
25,0	25	1	8,20	32,80
		2	6,23	24,93
		1+2	14,43	57,73
		3	3,77	15,08
		1+2+3	18,20	72,81
		4	2,86	11,44
25,0	50	1+2+3+4	21,06	84,25
		1	13,34	53,36
		2	7,63	30,51
		1+2	20,97	83,87
		3	2,53	10,11
		1+2+3	23,5	93,98
25,0	62,5	4	0,47	1,89
		1+2+3+4	23,97	95,87
		1	14,19	56,76
		2	7,05	28,21
		1+2	21,24	84,97
		3	2,22	8,89
25,0	75	1+2+3	23,46	93,86
		4	0,62	2,46
		1+2+3+4	24,08	96,32
		1	14,72	58,89



Окончание табл. 1

1	2	3	4	5
		2	6,56	26,23
		1+2	21,28	85,12
		3	2,28	9,14
		1+2+3	23,56	94,26
		4	0,50	2,00
		1+2+3+4	24,06	96,26
25,0	100	1	15,47	61,89
		2	6,41	25,63
		1+2	21,88	87,52
		3	1,95	7,79
		1+2+3	23,83	95,31
		4	0,30	1,19
		1+2+3+4	24,13	96,50

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

Как свидетельствуют данные эксперимента, представленные в табл. 2, увеличение содержания хлорамбуцила 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%. Это обстоятельство позволяет предположить, что взаимодействие молекул хлорамбуцила со структурными элементами ткани печени не приводит к образованию достаточно прочных связей.

Таблица 2

Зависимость степени извлечения (R, %) хлорамбуцила из ткани печени от количества хлорамбуцила и биологического материала (по массе) (n = 5; P = 0,95)

Внесено хлорамбуцила, мг в 25 г биоматериала	Найдено, %				
	\bar{X}	S	$S_{\bar{x}}$	$\Delta \bar{X}$	ϵ
50,0	84,83	2,17	0,97	2,50	2,94
25,0	83,99	2,53	1,13	2,91	3,47
12,5	83,80	2,74	1,22	3,15	3,75
5,0	83,65	2,91	1,30	3,35	4,00
2,5	82,89	3,41	1,52	3,91	4,72

Использование в качестве изолирующего агента ацетона и предложенные условия изолирования позволяют достичь достаточно высокой степени извлечения анализируемого вещества из ткани трупной печени. Предложенная методика достаточно хорошо воспроизводима, отличается простотой выполнения, не требует применения сложной аппаратуры и значительных затрат времени на воспроизведение. Она может быть использована в практике при проведении экспертизы в случае отравления хлорамбуцилом.

Выводы:

1. Изучена возможность использования ацетона в качестве изолирующего агента при химико-токсикологическом исследовании хлорамбуцила.
2. Определены оптимальные условия изолирования хлорамбуцила ацетоном из биологического материала.
3. Дана количественная оценка изолирования ацетоном рассматриваемого вещества из модельных смесей с тканью печени.



Литература

1. Влияние хронической задержки мочеиспускания и канцерогенов на развитие поверхностного рака мочевого пузыря / В.Н. Павлов, С.Л. Попов, В.З. Галимзянов и др. // Человек и его здоровье: Курский научно-практический вестник. – 2009. – № 3. – С. 121-124.
2. Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский // Пособие для врачей. – М.: Новая волна, 2008. – 1206 с.
3. Improving the spectrophotometric determination of the alkylating activity of anticancer agents: a new insight into the mechanism of the NBP method / K.M. Dierickx, F. Journe, P. Gerbaux and others // Talanta. – 2009. – Vol. 77, № 4. – P. 1370-1375.
4. Toxicity of High-Dose Chlorambucil in Wistar Rats / J. Tomenendálová, J. Mayer, M. Doubek and others // Acta. Vet. Brno. – 2008. – Vol. 77, № 4. – P. 595-602.
5. Chlorambucil overdose: accidental ingestion of an antineoplastic drug / S.A. Vandenberg, K. Kulig, D. G. Spoerke and others // J. Emerg. Med. – 1988. – № 6. – P. 495-498.

CHLORAMBUCIL ISOLATION OF BIOLOGICAL MATERIAL

V.K. SHORMANOV
M.L. STOLYAROV

*Kursk State
Medical University*

e-mail: r-wladimir@yandex.ru

As isolating agent for extraction of biological material chlorambucil acetone was proposed. The optimal conditions were clarified for isolation of chlorambucil human cadaver liver acetone and quantified isolation results.

Key words: chlorambucil, isolation, forensic chemical analysis, TLC, spectrophotometry.