

Особенности распределения пиридостигмина бромид в организме теплокровных животных при внутрижелудочном введении

В.К. Шорманов¹, М.И. Алёхина², Е.А. Коваленко¹, Д.В. Астафьев¹

¹Курский государственный медицинский университет,

Российская Федерация, 305004, Курск, ул. Карла Маркса, д. 3;

²Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко,

Российская Федерация, 394036, Воронеж, ул. Студенческая, д. 10

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Шорманов Владимир Камбулатович – профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета (КГМУ), доктор фармацевтических наук. Тел.: +7 (4712)-58-13-23. E-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru. ORCID: 0000-0001-8872-0691

Алёхина Мария Игоревна – ассистент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко. Тел.: +7 (473) 253-02-49. E-mail: pharmchem.vgma@mail.ru. ORCID: 0000-0001-8946-9718

Коваленко Евгений Анатольевич – ассистент кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии КГМУ, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (4712)-58-13-23. E-mail: olefar@yandex.ru

Астафьев Дмитрий Владимирович – студент фармацевтического факультета КГМУ. E-mail: dmitr.astafjew@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Введение. Пиридостигмина бромид – лекарственное средство антихолинэстеразного действия, применяющееся для лечения миастении и в качестве антидота при отравлениях фосфорорганическими веществами. Данное вещество токсично для теплокровных и может являться причиной отравления людей, в том числе с летальным исходом.

Цель исследования – изучение распределения пиридостигмина бромид в организме теплокровных животных (крысы) при внутрижелудочном введении тройной LD₅₀ данного вещества.

Материал и методы. Объект исследования – пиридостигмина бромид. При выполнении исследования использовались такие методы анализа, как тонкослойная хроматография (ТСХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), УФ-спектрофотометрия. Мужским особям крыс породы Wistar однократно вводили в желудок тройную LD₅₀ пиридостигмина бромид в виде водной суспензии. Анализируемое соединение изолировали из тканей органов и крови погибших животных ацетоном, очищали путем замены растворителя и последующего хроматографирования методом ТСХ с использованием модели привитой неподвижной фазы C14–C15 и подвижной фазы буферный раствор с рН 1,98 – ацетон (8:2 по объему).

Результаты. Пиридостигмина бромид в биологических объектах идентифицировали по величине абсолютной хроматографической подвижности (ТСХ), времени удерживания в колонке сорбента (ВЭЖХ) и особенностям поглощения в УФ-области спектра. Оценку количественного содержания пиридостигмина в биологических объектах осуществляли методом УФ-спектрофотометрии. Разработанные методики определения аналита в биологических объектах валидировали по показателям линейности, селективности, правильности, прецизионности, пределам обнаружения и количественного определения.

Заключение. Установлено преимущественное присутствие пиридостигмина (мкг в 1 г биоматериала) в селезенке (340,8±18,51), стенке желудка (240,6±21,79), содержимом желудка (209,8±13,35) и сердце (191,2±15,49) подопытных животных.

Ключевые слова: пиридостигмина бромид (калимин), распределение в организме, химико-токсикологическое исследование, валидация.

Для цитирования: Шорманов В.К., Алёхина М.И., Коваленко Е.А., Астафьев Д.В. Особенности распределения пиридостигмина бромид в организме теплокровных животных при внутрижелудочном введении. Фармация, 2020; 70 (2): 50–56. <https://doi.org/10/29296/25419218-2020-02-09>

FEATURES OF THE BODY DISTRIBUTION OF PYRIDOSTIGMINE BROMIDE IN WARM-BLOODED ANIMALS FOLLOWING ITS INTRAGASTRIC ADMINISTRATION

V.K. Shormanov¹, M.I. Alyokhina², E.A. Kovalenko¹, D.V. Astafyev¹

¹Kursk State Medical University, 3, Karl Marx St., Kursk 305004, Russian Federation

²N.N. Burdenko Voronezh State Medical University, 10, Studencheskaya St., Voronezh 394036, Russian Federation

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Shormanov Vladimir Kamulatovich – professor of department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry of Kursk State Medical University, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor. Tel.: +7 (4712)-58-13-23. E-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru. ORCID: 0000-0001-8872-0691

Alekhina Mariya Igorevna – assistant of professor of department of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of Voronezh State Medical University by Burdenko N.N. Tel.: +7 (473) 253-02-49. E-mail: pharmchem.vgma@mail.ru. ORCID: 0000-0001-8946-9718

Kovalenko Evgeniy Anatolevich – assistant of the department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry of Kursk State Medical University, PhD. Tel.: +7 (4712)-58-13-23. E-mail: olefar@yandex.ru

Astaph'ev Dmitriy Vladimirovich – student of department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry of Kursk State Medical University. E-mail: dmitr.astafjew@yandex.ru

SUMMARY

Introduction. Pyridostigmine bromide is an anticholinesterase drug used to treat myasthenia gravis and as an antidote for organophosphate poisoning. This substance is toxic to warm-blooded animals and can cause poisoning in humans or death.

Objective: to study of the body distribution of pyridostigmine bromide in warm-blooded animals (rats) after intragastric administration of a triple LD50 of this substance.

Material and methods. Pyridostigmine bromide was the object of the investigation. The latter used analytical methods, such as thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), and UV spectrophotometry. Male Wistar rats were intragastrically injected with a triple LD50 of pyridostigmine bromide as an aqueous suspension. The compound analyzed was isolated with acetone from the tissues of the organs and blood of dead animals, purified by replacing the solvent and by subsequent TLC using a model of the grafted stationary phase C14-C15 and the mobile phase buffer solution (pH 1.98)/ acetone = 8/2 (v/v).

Results. Pyridostigmine bromide in biological objects was identified by the value of absolute chromatographic mobility (TLC), retention time in a sorbent column (HPLC), and absorption characteristics in the UV region of the spectrum. The content of pyridostigmine in the biological objects was estimated by UV spectrophotometry. The developed methods for determining the analyte in the biological objects were validated by linearity, selectivity, accuracy, precision, detection limits, and quantitative indicators.

Conclusion. Pyridostigmine ($\mu\text{g/g}$ of biomaterial) was found to be predominantly present in the spleen (340.8 ± 18.51), gastric wall (240.6 ± 21.79), gastric contents (209.8 ± 13.35), and heart (191.2 ± 15.49) of experimental animals.

Key words: pyridostigmine bromide (Kalimin), body distribution, chemical and toxicological study, validation.

For citation: Shormanov V.K., Alyokhina M.I., Kovalenko E.A., Astafyev D.V. Features of the body distribution of pyridostigmine bromide in warm-blooded animals following its intragastric administration. *Farmatsiya (Pharmacy)*, 2020; 70 (1): 50–56. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-02-09>

Введение

Пиридостигмина бромид (3-[[Диметиламино]карбонил]окси]-1-метилпиридиния бромид) (торговые названия: «Калимин 60Н», «Местинон») – антихолинэстеразное средство, применяющееся для лечения миастении, а также как антидот при отравлениях фосфорорганическими веществами.

Вещество представляет собой белые кристаллы с приятным запахом, гигроскопичные, чувствительные к прямому солнечному свету и действию окислителей, плавящиеся при температуре от 152°C до 154°C , обладающие хорошей растворимостью в воде (52 мг/мл), этиловом спирте 96%, хлороформе, практически нерастворимые в эфире и бензоле. Молекулярная масса – 261,1 г/моль [1–3].

Пиридостигмина бромид токсичен для теплокровных животных. Его LD_{50} при пероральном введении крысам составляет 37,5 мг/кг, при подкожном – 3,1 мкг/кг, при внутрибрюшинном – 2,699 мг/кг [1,4]. При назначении данного лекарственного средства (ЛС) возможны серьезные побочные эффекты, которые могут стать причиной смерти больного [5, 6].

Идентификация пиридостигмина бромида может быть проведена методом УФ-спектрофотометрии как непосредственно, так и после переведения аналита в 3-гидрокси-1-метилпиридиния бромид [2, 7]. После переведения пиридостигмина бромида в 3-гидрокси-1-метилпиридиния бромид он может быть также определен методом экстракционной фотометрии на основе хромогенных реакций с некоторыми кислотными красителями [8]. Для идентификации рассматриваемого соединения и его количественного определения применяется метод ВЭЖХ

с УФ-детектированием в области длин волн 220 и 270 нм с использованием колонок обращенно-фазовых сорбентов и полярных элюентов, включающих ацетонитрил [2, 3, 9]. Известны варианты определения пиридостигмина бромида методами газовой хроматографии (ГХ) и газовой хроматографии и масс-спектрометрии (ГХ-МС) в извлечениях из биологических жидкостей (плазмы крови, мочи) [10, 11].

Для изолирования исследуемого вещества из плазмы крови используется дихлорметан. Очистка извлечений при этом проводится путем осаждения растворами кислот или смесью раствора пикриновой кислоты и 0,1М раствора натрия гидроксида (рН=7,0), а также реэкстракцией в 1 мМ раствор гидросульфата тетрабутиламмония [10]. Изолирование пиридостигмина и его метаболитов из биожидкостей возможно методом твердофазной экстракции с применением картриджей C18 SEP PAK, Corasil II и Bond Elut CBA [9,10]. Известен вариант изолирования пиридостигмина бромида из плазмы крови человека методом жидкость-жидкостной экстракции [12]. Для извлечения пиридостигмина из жидких биоматриц и очистки также используют ионопарную экстракцию [11] и сорбцию на ионообменных смолах [13, 14].

Большинство указанных методик рассчитано на исследования извлечений из биожидкостей и не может без предварительной модификации применяться для работы с внутренними органами. Часть этих методик характеризуется сложностью, длительностью и необходимостью использования дорогостоящего оборудования. Данные о распределении пиридостигмина у теплокровных при летальных отравлениях в литературе отсутствуют, что затрудняет выбор оптимальных био-

логических объектов при проведении химико-токсикологического анализа.

Цель данного исследования – изучение распределения пиридостигмина бромида в организме теплокровных животных (крысы) при внутрижелудочном введении тройной LD_{50} данного вещества.

Материал и методы

В качестве объекта исследования рассмотрен пиридостигмина бромид (ФС 000922-110914) с содержанием вещества 98,5–100,5%.

Подопытные животные: 6-месячные мужские особи крыс породы Wistar массой от 435 до 455 г. Перед началом эксперимента животные в течение 24 ч не получали пищи, но имели возможность употреблять воду. Экспериментальные животные были разделены на 5 опытных групп по 5 особей в каждой. Всем животным вводили однократно в желудок с помощью зонда 0,06 г ($\approx 3 \times LD_{50}$) пиридостигмина бромид в виде 4% водного раствора.

Трупы отравленных животных подвергали вскрытию, одинаковые органы, взятые от животных той или иной группы, объединяли, измельчали, получая частицы размерами от 2 до 4 мм, и обнаруживали в них пиридостигмин. Такие же действия выполняли и с органами животных контрольной группы (5 особей), в желудок которых вводили дистиллированную воду.

Предложены и валидированы методики определения пиридостигмина в органах и крови крыс.

Изолирование. Оптимальные условия изолирования соответствовали двукратному (каждый раз в течение 45 мин) настаиванию образца измельченных тканей органа или крови ацетоном при периодическом помешивании. 1-е и 2-е извлечения объединяли и центрифугировали. Объединенный центрифугат испаряли на водяной бане до полного удаления растворяющей среды. Сухой остаток растворяли в 4 мл ацетона (раствор для исследования).

Идентификация методом ТСХ. На линии старта 2 хроматографических пластин (1 и 2) «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ, обработанных раствором вазелинового масла в гексане (модель обращенной фазы С14–С15), наносили по 0,6 мл раствора для исследования и хроматографировали в присутствии вещества-свидетеля, используя подвижную фазу: буферный раствор с $pH=1,98$ – ацетон (8:2 по объему).

Идентификация методом ВЭЖХ. Проведя идентификацию методом ТСХ, область хроматограммы (пластина 1) с пятном анализируемого

соединения вырезали, вносили в пробирку и элюировали пиридостигмин из сорбента этанолом в течение 15 мин при периодическом помешивании. Полученный элюат отделяли, а элюент испаряли в токе воздуха при температуре 18–22°C. Остаток растворяли в 4 мл полярной смеси растворителей. 20 мкл полученного раствора вводили в хроматограф LC-20 Prominence фирмы Shimadzu с диодно-матричным детектором. Процесс хроматографирования осуществляли в колонке обращенно-фазового сорбента. Анализируемое соединение идентифицировали по времени удерживания (tR).

Идентификация по УФ-спектру и количественное определение. Проведя идентификацию методом ТСХ, область хроматограммы (пластина 2) с пятном анализируемого соединения вырезали, вносили в пробирку и элюировали пиридостигмин из сорбента этиловым спиртом (настаивание в течение 15 мин с 5 мл спирта при периодическом помешивании). Полученный элюат отделяли и измеряли его оптическую плотность на спектрофотометре СФ-56 (кварцевые кюветы, $l = 1$ см, волновой диапазон – 200–350 нм). При значениях оптической плотности 1,2 элюат разбавляли.

Валидацию методик определения пиридостигмина в твердых (ткани органов) и жидкой (крови) матрицах на основе УФ-спектрофотометрии осуществляли по критериям линейности, селективности, правильности, прецизионности, пределам обнаружения и количественного определения, согласно правилам для биоаналитических методик [15].

Извлечения из биоматериала крыс контрольной группы исследовали по той же схеме, что и извлечения из внутренних органов животных, отравленных пиридостигмина бромидом.

Результаты и обсуждение

При идентификации методом ТСХ хроматограммы проявляли, облучая их УФ-светом с длиной волны 254 нм. Пиридостигмин в этом случае можно было наблюдать в виде темного пятна на светлом фоне пластины. Значение R_f анализируемого соединения было равно $0,45 \pm 0,03$.

Проводя идентификацию методом ВЭЖХ, в качестве полярной смеси растворителей для растворения сухого остатка, содержащего аналит, применяли смесь 0,02% раствора дигидрофосфата калия с $pH 3,0$, ацетонитрила и метилового спирта, взятых в объемных отношениях 92,5 : 5 : 2,5. Хроматографировали в колонке сорбента с привитыми алкильными радикалами C18 Luna

5и С18(2) 100А размерами 150×4,60 мм, термоста-тируя колонку при температуре 40°С и элюируя полярной подвижной фазой 0,02% раствор дигидрофосфата калия с рН 3,0 (корректировка ортофосфорной кислотой) – ацетонитрил-метанол (92,5:5:2,5 по объему) со скоростью 1,0 мл/мин. Сигнал регистрировали при длине волны 215 нм. В предлагаемых условиях хроматографирования значение времени удерживания (tR) анализируемого вещества, изолированного из различных органов и крови, соответствовало 157,2±7,3 с.

Спектральные линии пиридостигмина, изолированного из биологических объектов (см. рисунок), имели в среде этилового спирта те же формы и точки экстремумов, что и спектральная линия стандарта аналита в этом растворителе (206±4 и 272±2 нм).

На основании валидации по критерию линейности удалось вывести следующие уравнения регрессии для методик определения пиридостигмина в твердых матрицах и крови: $A = 3,886987 \cdot C - 0,008111$ (коэффициент корреляции 0,99734) и $A = 4,308712 \cdot C + 0,001133$ (коэффициент корреляции 0,99812), где А – величина оптической плотности; С – концентрация исследуемого соединения в биологическом образце, мг/г. Разработанные методики соответствуют регламентируемому уровню линейности (коэффициенты корреляции в обоих случаях >0,995). Область линейности градуировочных графиков наблюдается для концентраций аналита 0,01–0,28 мг/г. Отклонения содержания аналита в градуировочных смесях, рассчитанные по уравнениям регрессии, от заданных значений приведены в табл. 1. Эти отклонения находятся в допустимых пределах (не превышают ±20% для наименьшей градуировочной концентрации и не превышают ±15% для прочих концентраций).

Результаты по определению правильности и прецизионности разработанных методик приведены в табл. 2 и 3. Результаты исследования свидетельствуют о соответствии методик критериям правильности: относительная погрешность (к внесенной массе аналита) < ±20% и прецизионности (относительное стандартное отклонение – S_r) < 20%.

На селективность разработанных методик указывает отсутствие в контрольных УФ-спектрах выраженных полос поглощения и заметных сдвигов спектральной линии вблизи аналитического максимума (272 нм).

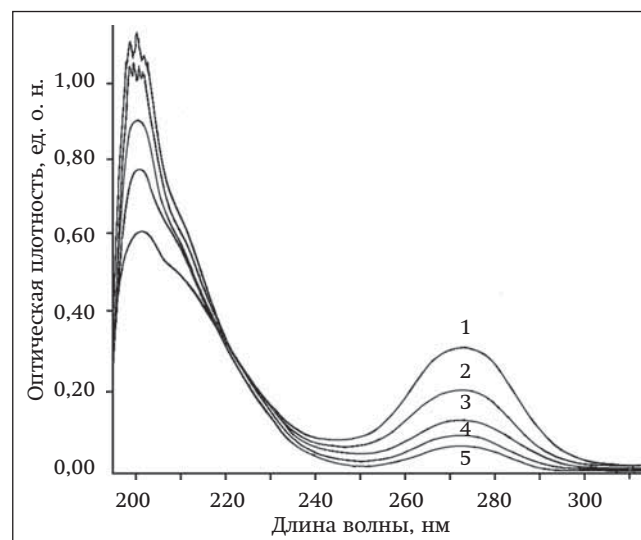
Для методик определения пиридостигмина в твердых матрицах и крови предел обнаружения (ПО) составил 0,005 мг/г, а предел количественного определения (ПКО) – 0,01 мг/г.

При изучении биологического материала организмов животных контрольной группы установлено отсутствие в них пиридостигмина или соединений близкой структуры. Фоновое поглощение элюатов из участков контрольных хроматограмм в пересчете на извлечение из 5 г одинаковых органов животных, измеренное при длинах волн 206 и 272 нм не превышало соответственно 0,091 и 0,014 единиц оптической плотности. Количественное содержание исследуемого соединения определяли, исходя из оптической плотности этанольного элюата в области 272 нм.

Результаты оценки содержания пиридостигмина в органах, крови и содержимом желудка погибших животных представлены в табл. 4. Согласно данным табл. 4, пиридостигмин в большей степени обнаруживается в селезенке (340,8±18,51), стенке желудка (240,6±21,79), содержимом желудка (209,8±13,35) и сердце (191,2±15,49) отравленных животных. Несколько меньшие его количества найдены в мышечной ткани, почках и легких погибших животных.

Заключение

При изучении особенностей распределения пиридостигмина бромиды в организме всеядных



Спектральные кривые пиридостигмина в этиловом спирте: 1 – вещество, извлеченное из селезенки; 2 – вещество, извлеченное из стенки желудка; 3 – 0,0016% раствор вещества-стандарта; 4 – вещество, извлеченное из содержимого желудка; 5 – вещество, извлеченное из сердца
Spectral curves of pyridostigmine in ethanol: 1 – a substance extracted from the spleen; 2 – a substance extracted from the gastric wall; 3 – 0.0016% solution of the standard substance; 4 – a substance extracted from the gastric contents; 5 – a substance extracted from the heart

Таблица 1

Отклонения найденных концентраций градуировочных смесей от истинного содержания в них пиридостигмина (n=5)

Table 1

Deviations of the found concentrations of calibration mixtures from their true content of pyridostigmine (n=5)

| Спектрофотометрическое определение аналита в твердых биоматрицах (на примере ткани печени) | | | | | | | | | |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Истинное содержание пиридостигмина, мг/г | 0,01 | 0,02 | 0,03 | 0,08 | 0,12 | 0,16 | 0,20 | 0,24 | 0,28 |
| Найденное содержание пиридостигмина, мкг/г | 0,011814 | 0,020350 | 0,027955 | 0,072419 | 0,121629 | 0,165892 | 0,199553 | 0,252870 | 0,267519 |
| Относительная погрешность, % | 18,14 | 1,75 | -6,82 | -9,48 | 1,36 | 3,68 | -1,12 | 5,36 | -4,46 |
| Спектрофотометрическое определение аналита в крови | | | | | | | | | |
| Истинное содержание пиридостигмина, мг/г | 0,01 | 0,02 | 0,03 | 0,08 | 0,12 | 0,16 | 0,20 | 0,24 | 0,28 |
| Найденное содержание пиридостигмина, мкг/г | 0,008772 | 0,022226 | 0,031547 | 0,074525 | 0,118397 | 0,163761 | 0,209936 | 0,227984 | 0,283453 |
| Относительная погрешность, % | -12,28 | 11,13 | 5,16 | -6,84 | -0,80 | 2,35 | 4,67 | -5,01 | 1,23 |

Примечание: допустимый предел колебания наименьшей концентрации линейного диапазона – не более 20%, остальных концентраций линейного диапазона – не более 15%.

Note: the permissible limit of fluctuation of the lowest concentration in the linear range is not more than 20%; that of other concentrations in the linear range is not more than 15%.

Таблица 2

Оценка правильности и прецизионности методики определения пиридостигмина в твердых биоматрицах с использованием УФ-спектрофотометрии по поглощению в среде этилового спирта

Table 2

Estimation of the correctness and precision of a procedure for determining pyridostigmine in solid biomatrices using UV spectrophotometry by absorption in ethyl alcohol media

| Внесено аналита | | Исследование в первый день | | | Исследование в последующий день | | |
|----------------------|---------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| мг в 25 г биоматрицы | мг в 1 г биоматрицы | найдено, мг в 1 г биоматрицы | относительная погрешность, % | метрологические характеристики | найдено, мг в 1 г биоматрицы | относительная погрешность, % | метрологические характеристики |
| 0,75 | 0,03 | 0,03102 | 6,06 | $\bar{x}=0,03181$; $S=0,00178$; | 0,02533 | -12,29 | $\bar{x}=0,02631$; |
| 0,75 | 0,03 | 0,03429 | | $S_x=0,00080$; | 0,02589 | | $S=0,00143$; |
| 0,75 | 0,03 | 0,03237 | | $\Delta\bar{x}=0,00221$; | 0,02474 | | $S_x=0,00064$; |
| 0,75 | 0,03 | 0,03196 | | $\bar{e}=6,96$; | 0,02805 | | $\Delta\bar{x}=0,00178$; |
| 0,75 | 0,03 | 0,02945 | | $S_f=5,59573\%$ | 0,02756 | | $\bar{e}=6,76$; |
| | | | | | | | $S_f=5,43520\%$ |
| 3,00 | 0,12 | 0,13081 | 8,44 | $\bar{x}=0,13013$; | 0,11913 | 5,43 | $\bar{x}=0,12652$; |
| 3,00 | 0,12 | 0,12138 | | $S=0,00600$; | 0,13494 | | $S=0,00603$; |
| 3,00 | 0,12 | 0,12793 | | $S_x=0,00268$; | 0,12589 | | $S_x=0,00270$; |
| 3,00 | 0,12 | 0,13742 | | $\Delta\bar{x}=0,00746$; | 0,12321 | | $\Delta\bar{x}=0,00749$; |
| 3,00 | 0,12 | 0,13312 | | $\bar{e}=5,73$; | 0,12942 | | $\bar{e}=5,92$; |
| | | | | $S_f=4,61077\%$ | | | $S_f=4,76605\%$ |
| 6,00 | 0,24 | 0,24263 | 4,59 | $\bar{x}=0,25103$; | 0,26509 | 9,43 | $\bar{x}=0,26284$; |
| 6,00 | 0,24 | 0,26415 | | $S=0,01071$; | 0,24946 | | $S=0,01104$; |
| 6,00 | 0,24 | 0,23887 | | $S_x=0,00479$; | 0,27087 | | $S_x=0,00494$; |
| 6,00 | 0,24 | 0,25926 | | $\Delta\bar{x}=0,01332$; | 0,27521 | | $\Delta\bar{x}=0,01373$; |
| 6,00 | 0,24 | 0,25022 | | $\bar{e}=5,31$; | 0,25355 | | $\bar{e}=5,22$; |
| | | | | $S_f=4,26642\%$ | | | $S_f=4,20027\%$ |

Таблица 3

Оценка правильности и прецизионности методики определения пиридостигмина в крови с использованием УФ-спектрофотометрии

Table 3

Estimation of the correctness and precision of a procedure for determining pyridostigmine in blood using UV spectrophotometry

| Внесено анализа | | Исследование в первый день | | | Исследование в последующий день | | |
|----------------------|---------------------|------------------------------|------------------------------|---|---------------------------------|------------------------------|---|
| мг в 25 г биоматрицы | мг в 1 г биоматрицы | найдено, мг в 1 г биоматрицы | относительная погрешность, % | метрологические характеристики | найдено, мг в 1 г биоматрицы | относительная погрешность, % | метрологические характеристики |
| 0,75 | 0,03 | 0,03076 | 9,42 | $\bar{x}=0,03283$; $S=0,00175$; $S_x=0,00078$; $\Delta\bar{x}=0,00218$; $\bar{\varepsilon}=6,63$; $S_r=5,33049\%$ | 0,0329 | 6,24 | $\bar{x}=0,03187$; $S=0,00165$; $S_x=0,00074$; $\Delta\bar{x}=0,00205$; $\bar{\varepsilon}=6,44$; $S_r=5,17728\%$ |
| 0,75 | 0,03 | 0,03395 | | 0,03157 | | | |
| 0,75 | 0,03 | 0,03518 | | 0,03101 | | | |
| 0,75 | 0,03 | 0,03181 | | 0,03406 | | | |
| 0,75 | 0,03 | 0,03243 | | 0,02982 | | | |
| 3,00 | 0,12 | 0,13623 | 7,22 | $\bar{x}=0,12867$; $S=0,00573$; $S_x=0,00256$; $\Delta\bar{x}=0,00712$; $\bar{\varepsilon}=5,53$; $S_r=4,45325\%$ | 0,10886 | -3,06 | $\bar{x}=0,11633$; $S=0,00502$; $S_x=0,00224$; $\Delta\bar{x}=0,00624$; $\bar{\varepsilon}=5,36$; $S_r=4,31531\%$ |
| 3,00 | 0,12 | 0,12212 | | 0,11957 | | | |
| 3,00 | 0,12 | 0,12906 | | 0,11641 | | | |
| 3,00 | 0,12 | 0,13184 | | 0,12199 | | | |
| 3,00 | 0,12 | 0,12409 | | 0,11482 | | | |
| 6,00 | 0,24 | 0,20913 | -10,18 | $\bar{x}=0,21557$; $S=0,00852$; $S_x=0,00381$; $\Delta\bar{x}=0,01060$; $\bar{\varepsilon}=4,92$; $S_r=3,95231\%$ | 0,25831 | 4,41 | $\bar{x}=0,25058$; $S=0,01015$; $S_x=0,00454$; $\Delta\bar{x}=0,01261$; $\bar{\varepsilon}=5,03$; $S_r=4,05060\%$ |
| 6,00 | 0,24 | 0,22475 | | 0,26302 | | | |
| 6,00 | 0,24 | 0,2226 | | 0,24495 | | | |
| 6,00 | 0,24 | 0,21651 | | 0,23784 | | | |
| 6,00 | 0,24 | 0,20487 | | 0,24878 | | | |

теплокровных (крысы) при однократном внутривенном введении тройной LD₅₀ данного вещества выявлено, что наибольшее количество пиридостигмина (мкг в 1 г биоматериала) присутствует в селезенке (340,8±18,51), стенке желудка (240,6±21,79), содержимом желудка (209,8±13,35) и сердце (191,2±15,49) животных (крыс), отравленных этим веществом. Методики определения пиридостигмина в биологических объектах валидированы по линейности, селективности, правильности, прецизионности, пределам обнаружения и количественного определения и могут использоваться при направленном химико-токсикологическом анализе.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература/References

1. Pyridostigmine Bromide. PubChem. [Electronic resource]. Access mode: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/pyridostigmine_bromide#section=Top. [circulation date February 1, 2019].
2. European Pharmacopoeia Pyridostigmine bromide. 2013; 8(2): 3132–33.
3. Pyridostigmine bromide. ChemIDplus. [Electronic resource]. Access mode: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/101-26-8>. [circulation date February 1, 2019].
4. Bigoniya P., Singh A.K., Bigoniya D., Gopalan N. Pyridostigmine Bromide and Potassium Iodate: Subacute Oral Toxicity and Stability. Journal of Drug Metabolism and Toxicology, 2013; 4: 145. DOI: 10.4172/2157-7609.1000145
5. Агафонов Б.В., Котов С.В., Сидорова О.П. Миастения и врожденные миастенические синдромы. М.: Медицинское информационное агентство; 2013. [Agaphonov B.V., Kotov S.V., Sidorova O. P. Myasthenia and congenital myasthenic syndromes. Moscow: Medical Information Agency; 2013 (in Russian)].
6. Меркулова Д.М., Никитин С.С., Меркулов Ю.А. Алгоритмы диагностики и лечения кризовых состояний у больных миастенией гравис. Атмосфера. Нервные болезни, 2008; 2: 7–12. [Mercurlova D.M., Nikitin S.S., Merkulov U.A. Algorithms for diagnosis and treatment of crisis conditions in patients with myasthenia gravis. Atmosphere. Nervnye bolezni, 2008; 2: 7–12 (in Russian)].
7. Шорманов В.К., Дурицын Е.П., Илюшина Т.Н., Алёхина М.И. Изучение спектральных характеристик, способности к окислению и хроматографической подвижности в тонких слоях обращенно-фазно-

Результаты количественного определения пиридостигмина в извлечениях из биологических матриц отравленных животных (крыс)

Table 4

Results of quantitative determination of pyridostigmine in extracts from the biological matrices of poisoned animals (rats)

| Орган или биожидкость | 1 | 2 | | 5 | Орган или биожидкость | 1 | 2 | | 5 |
|-----------------------|-------|------|-----|-----------------------|------------------------------|-------|------|-----|-----------------------|
| | | 3 | 4 | | | | 3 | 4 | |
| Сердце | 6,94 | 1353 | 195 | $\bar{x}=191,2$ | Печень | 25,00 | 1025 | 41 | $\bar{x}=42,4$ |
| | 5,83 | 1219 | 209 | $S=12,46$ | | 25,00 | 1125 | 45 | $S=3,44$ |
| | 7,18 | 1257 | 175 | $S_x=5,57$ | | 25,00 | 1000 | 40 | $S_x=1,54$ |
| | 6,52 | 1245 | 191 | $\Delta\bar{x}=15,49$ | | 25,00 | 975 | 39 | |
| | 6,07 | 1129 | 186 | | | 25,00 | 1175 | 47 | $\Delta\bar{x}=4,37$ |
| Мышечная ткань | 10,00 | 1630 | 163 | $\bar{x}=154,8$ | Селезенка | 7,18 | 2585 | 360 | $\bar{x}=340,8$ |
| | 10,00 | 1530 | 153 | $S=14,01$ | | 6,95 | 2391 | 334 | $S=14,89$ |
| | 10,00 | 1740 | 174 | $S_x=6,26$ | | 5,68 | 1829 | 322 | $S_x=6,66$ |
| | 10,00 | 1450 | 145 | $\Delta\bar{x}=17,41$ | | 6,72 | 2359 | 351 | |
| | 10,00 | 1390 | 139 | | | 6,31 | 2127 | 337 | $\Delta\bar{x}=18,51$ |
| Кровь | 20,00 | 980 | 49 | $\bar{x}=49,4$ | Стенка желудка | 16,45 | 4055 | 247 | $\bar{x}=240,6$ |
| | 20,00 | 920 | 46 | $S=2,61$ | | 11,73 | 3120 | 266 | $S=17,53$ |
| | 20,00 | 960 | 48 | $S_x=1,17$ | | 13,61 | 3163 | 232 | $S_x=7,84$ |
| | 20,00 | 1040 | 52 | $\Delta\bar{x}=3,24$ | | 15,02 | 3590 | 239 | |
| | 20,00 | 1040 | 52 | | | 14,24 | 2927 | 219 | $\Delta\bar{x}=21,79$ |
| Легкие | 12,66 | 1051 | 83 | $\bar{x}=77,2$ | Содержимое желудка | 18,52 | 3611 | 195 | $\bar{x}=209,8$ |
| | 12,32 | 961 | 78 | $S=7,36$ | | 15,48 | 3282 | 212 | $S=22,53$ |
| | 11,38 | 763 | 67 | $S_x=3,29$ | | 23,19 | 5032 | 217 | $S_x=10,08$ |
| | 13,58 | 991 | 73 | $\Delta\bar{x}=9,15$ | | 24,77 | 5994 | 242 | |
| | 12,03 | 1023 | 85 | | | 21,14 | 3869 | 183 | $\Delta\bar{x}=13,35$ |
| Почки | 11,33 | 1088 | 96 | $\bar{x}=100,6$ | Тонкий кишечник с содержимым | 19,31 | 1004 | 52 | $\bar{x}=45,2$ |
| | 11,79 | 1297 | 110 | $S=6,99$ | | 23,62 | 1016 | 43 | $S=5,63$ |
| | 10,19 | 1060 | 104 | $S_x=3,12$ | | 22,26 | 824 | 37 | $S_x=2,52$ |
| | 12,20 | 1232 | 101 | $\Delta\bar{x}=8,68$ | | 18,84 | 904 | 48 | |
| | 10,88 | 1001 | 92 | | | 21,50 | 989 | 46 | $\Delta\bar{x}=7,00$ |

Примечание. ¹Масса биоматериала, взятая для исследования из суммарного для 5 особей количества биологического объекта, г; ²Найденное количество аналита, мкг; ³В исследуемой массе биологического объекта; ⁴В 1 г биологического объекта; ⁵Метрологические характеристики

го сорбента продукта метаболизма калимина 60 Н. Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2012; (2): 133–7. [Shormanov V.K, Duritsyn E.P, Ilyushina T.N, Alekhina M.I. Studing the spectral characteristics, the ability to oxidation and chromatographic mobility of metabolism product Kalimin 60 N by reversed thin-layer chromatography. Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik «Chelovek i ego zdorov'e», 2012; (2): 133–7 (in Russian)].

8. Алехина М.И., Никитина Т.Н., Шорманов В.К. Экстракционно-фотометрическое определение пиридостигмина бромид в виде метаболита в модельных смесях. Вестник Волгоградского государственного медицинского университета, 2017; 3(63): 23–5. [Alekhina M.I, Nikitina T.N, Shormanov V.K. Extraction-photometric determination of pyridostigmine bromide in the form of a metabolite in model mixtures. Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta, 2017; 3(63): 23–5 (in Russian)]. DOI: 10.19163/1994-9480-2017-3(63)-23-25

9. Abu-Qare A.W., Abou-Donia M.B. High-Performance Liquid Chromatographic determination of pyridostigmine bromide, nicotine, and their metabolites in rat plasma and urine. Journal of chromatographic science, 2001; 39(7): 287–92. DOI: 10.1093/chromsci/39.7.287

10. Zhao B., Mochhala S.M., Lu J., Tan D., Lai M.H. Determination of pyridostigmine bromide and its metabolites in biological samples. Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, 2006; 9 (1): 71–81.

11. Chan K., Dehghan A. The isolation and determination of neostigmine, pyridostigmine and their metabolites in human biological fluids. Journal of Pharmacological Methods, 1978; 1(4): 311–20. DOI: 10.1016/0160-5402(78)90062-1

12. Agarwal S., Gowda K.V., Mandal U., Ghosh D., Bose A., Sarkar A.K. Analysis of pyridostigmine bromide in human plasma and its application in bioequivalence studies. Journal of liquid chromatography and related technologies, 2007; 30: 2605–15. DOI:10.1080/10826070701540605

13. Panahia Y., Yousefia G., Sahebkarb A., Foroutanc S.M., Zarghic A., Shafahatid A., Khoddame A., Saadatf A. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of pyridostigmine in plasma. Asian Biomedicine, 2013; 7(2): 275–9. DOI: 10.5372/1905-7415.0702.176

14. Puram S.R., Batheja R., Nithya G. Highly sensitive and rapid evaluation of pyridostigmine impurity b in human plasma by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometer after administration of pyridostigmine to healthy volunteers in a pharmacokinetic study. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 2018; 11(6): 353–7. DOI: 10.22159/ajpcr.2018.v11i6.25038

15. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). London: EMEA/CHMP/EWP; 2009.

Поступила 16 февраля 2019 г.
Received 16 February 2019

Принята к публикации 4 июня 2019 г.
Accepted 4 June 2019