

Исследование химического состава препарата АСД-2Ф Абдрахманов В. И.¹, Сахипов В. Р.², Краснов В. Л.³

¹Абдрахманов Валерий Ильдусович / *Abdrahmanov Valery Ildusovich* – директор по развитию;

²Сахипов Валерий Ринатович / *Sahipov Valery Rinatovich* – начальник лаборатории ОТК,
ООО «Гамма-Хим НН»;

³Краснов Владимир Львович / *Krasnov Vladimir Lvovich* – кандидат химических наук, доцент,
кафедра «Химическая технология»,
Дзержинский политехнический институт (филиал),
Нижегородский государственный технический университет им. Р. Е. Алексеева,
г. Дзержинск, Нижегородская область

Аннотация: приведена количественная информация о химическом составе препарата АСД-2Ф, полученная методами спектроскопии протонного магнитного резонанса, высокоэффективной жидкостной хроматографии, хромато-масс-спектрометрии и ацидиметрическим титрованием, которая позволила найти органические соединения, определяющие его лечебно-профилактическое действие и показатели качества препарата.

Abstract: presented quantitative information on the chemical composition of a preparation ASD-2F obtained by proton magnetic resonance spectroscopy, high performance liquid chromatography, gas chromatography-mass spectrometry and acidimetric titration, which allowed to find organic compounds that determine its therapeutic and preventive action and indicators of the quality of the drug.

Ключевые слова: химический состав, антисептик-стимулятор Дорогова, препарат АСД-2Ф, спектроскопия протонного магнитного резонанса, высокоэффективная жидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия.

Keywords: chemical composition, Dorogov's antiseptic-stimulant, preparation ASD-2F, proton magnetic resonance spectroscopy, high performance liquid chromatography, gas chromatography-mass spectrometry.

Препарат АСД-2Ф является водной фракцией конденсированных веществ, получаемых в процессе пиролиза мясокостной муки с содержанием животных белков не менее 50 % в диапазоне температур 100-500°C [1]. Препарат АСД-2Ф широко и успешно применяется в ветеринарии уже более шестидесяти лет, однако, до сих пор не существует однозначного признанного мнения о химическом составе этой фракции, что в значительной мере ограничивает возможные сферы его применения и затрудняет достоверное определение показателей качества [2-6].

Для обоснования требований к препарату АСД-2Ф сначала [2] было установлено содержание воды (70-75 %) и аммонийных солей (10-15 %) в этой фракции. Предполагалось присутствие в препарате различных неорганических и органических азотистых соединений: аммиака, карбоната аммония, карбамината аммония, бикарбоната аммония, сульфида аммония, цианида аммония, роданида аммония. Среди органических веществ, которые были идентифицированы в водной фракции, присутствовали амины, амиды жирных кислот и отсутствовали ароматические соединения. Применение спектроскопии ядерного магнитного резонанса [3-5] позволило предложить использовать ПМР – спектр в качестве «дактилоскопического паспорта» препарата АСД-2Ф. Данные спектроскопии протонного магнитного резонанса (ПМР) свидетельствуют [3-5] о наличии в препарате алифатических органических соединений, а именно амидов карбоновых кислот, холина и холиновых эфиров, алициклических производных карбамида, метилсульфидов.

По мнению авторов [6], проводивших исследование АСД-2Ф методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), в препарате содержится до 18 г/л аминокислот в свободном и связанном виде.

Использование метода хромато-масс-спектрометрии [8] позволило получить наиболее полное, на сегодняшний день, описание химического состава «органической части» АСД-2Ф, включающей 121 вещество.

В настоящей статье представлены результаты обобщения исследований в данной области. В качестве объектов исследований использовали образцы готовой формы препарата АСД-2Ф, произведенные совместно ООО «АРЕАЛ МЕДИКАЛ» и ООО «НВЦ Агрорезащита», различных серий, выпущенные в период с ноября 2014 г. по май 2015 г.

Подлинность субстанции определяли органолептически по внешнему виду и запаху и проверяли методом спектроскопии ПМР в соответствии с рекомендациями [3-5].

Такие характеристики субстанции, как плотность и *pH* определялись общепринятыми методами. Было установлено, что неорганическая часть препарата практически полностью состоит из карбоната аммония, который был выделен из субстанции АСД-2Ф высаливанием изопропиловым спиртом, а также нагреванием субстанции в диапазоне температур 50-100°C с последующей конденсацией карбоната, и идентифицирован общеизвестными реакциями.

Количественное определение содержания карбоната аммония проводили ацидиметрическим титрованием субстанции АСД-2Ф по схеме, предложенной нами и опубликованной в данном журнале [7].

Кривые титрования разбавленной субстанции АСД-2Ф рабочим раствором соляной кислоты, полученные методом *pH*-метрии, содержали две точки эквивалентности в области $pH_1=7.65$ и $pH_2=4.07$, соответствующие двум ступеням титрования карбоната аммония, превращающегося сначала в гидрокарбонат аммония, согласно реакции I, и затем в хлорид аммония и угольную кислоту, согласно реакции II:



Для расчета с помощью формулы (1) содержания карбоната аммония $m((NH_4)_2CO_3)$, г/л, достаточно определить объем $0,1n$ соляной кислоты, затрачиваемый на титрование разбавленной субстанции АСД-2Ф от 1-ой до 2-ой точки эквивалентности ($V_{TЭ2} - V_{TЭ1}$).

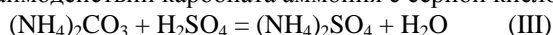
$$m((NH_4)_2CO_3) = \frac{9,6V_k}{V_{АСД}V_n} (V_{TЭ2} - V_{TЭ1}) \quad (1)$$

Здесь V_k - объем мерной колбы, $V_{АСД}$ - объем пробы, V_n - объем пипетки.

Например, если согласно результатам титрования 10 мл АСД-2Ф, приведенным в работе [7], принять $(V_{TЭ2} - V_{TЭ1}) = 12,5$ мл, $V_k/V_n = 25$, то содержание карбоната аммония $m((NH_4)_2CO_3)$ составляет 300 г/л. В таблице представлены результаты определения содержания карбоната аммония в трех образцах препарата АСД-2Ф, изменяющегося в диапазоне 286–319 г/л при плотности субстанции 1080–1100 г/л.

Приведенные в таблице результаты вместе с данными по содержанию воды служат рамкой для информационной картины, отражающей химический состав фракции. Особенность этой картины в том, что неорганическая «рамка», представляющая собой водный раствор карбоната аммония, занимает 93–95 % всей субстанции, в то время как на многочисленные органические вещества, часть которых, несомненно, ответственна за уникальное лечебно-профилактическое действие препарата, приходится лишь 5–7 % массы субстанции АСД-2Ф.

Для правильной интерпретации приведенных в таблице данных следует учитывать, что экспериментальные результаты определения содержания воды в субстанции ($m(H_2O)_{эксп.}$), изменяющиеся в диапазоне 780–796 г/л, получали путем азеотропной дистилляции образца препарата объемом 10 мл по методу [10]. В круглодонную колбу заливали 10 мл препарата АСД-2Ф, добавляли концентрированную серную кислоту для нейтрализации образца и 60 мл бензола. Вода образует с бензолом азеотропную смесь и при кипячении с помощью насадки Дина-Старка собирается в водоотделителе, а бензол возвращается обратно в колбу. Содержание воды рассчитывается по формуле: $m(H_2O)_{эксп.} = 100 V(H_2O)$, где $V(H_2O)$ – объем воды в мл. При этом вместе с водой, имеющейся в препарате до нейтрализации, определялась вода, выделяющаяся при взаимодействии карбоната аммония с серной кислотой по реакции III:



Количество воды, выделившейся при нейтрализации карбоната аммония и получившей, соответственно, наименование «связанной», определяли расчетным путём: $m(H_2O)_{связ.} = 0,1875 m((NH_4)_2CO_3)$. Соответственно, если термином «свободная» вода обозначить содержание воды в препарате до нейтрализации, то оно может быть рассчитано как разность между экспериментально определяемым количеством воды и «связанной» водой: $m(H_2O)_{свободн.} = m(H_2O)_{эксп.} - m(H_2O)_{связ.}$

Для расчета массы органических веществ, содержащихся в препарате АСД-2Ф, из массы препарата вычитали массу раствора карбоната аммония: $m_{орг.в.в.} (расч.) = 1000\rho - m(H_2O)_{свободн.} - m((NH_4)_2CO_3)$.

Поскольку известно, что карбонат аммония полностью разлагается на аммиак и углекислый газ при нагревании, оказалось возможным экспериментально определить содержание органических веществ в субстанции. Для обеспечения максимальной сохранности органических веществ упаривание раствора карбоната аммония проводили следующим образом: предварительно препарат наносили на подложку из аэросила (оксид кремния) марки А-300, после чего полученные образцы нагревали при температуре не выше 65°C до прекращения выделения аммиака. Далее в образцах проверяли наличие карбоната аммония, и при его отсутствии определяли содержание воды по методу [10] (без использования серной кислоты).

После этого массу органических веществ на подложке определяли экспериментально, прокаливая образцы в муфельной печи. В полученных образцах определяли также содержание «общего» азота по Кьельдалю согласно методике [11]. Полученные результаты представлены в таблице.

Химический состав органической части препарата изучали по результатам работы [8], в которой приведены экспериментальные данные, полученные методом хромато-масс-спектрометрии.

Вещества, найденные этим методом в препарате АСД-2Ф, объединяли в группы по родственным признакам, касающихся особенностей их химического строения и состава, изучали литературные данные по биологической активности, что позволило выявить вещества, определяющие, на наш взгляд, лечебно-профилактическое действие препарата.

Таблица 1. Показатели препарата АСД-2Ф

№ п/п	Наименование показателей		Результаты		
1	Внешний вид, цвет, запах, наличие осадка		Жидкость красновато-коричневого цвета со специфическим запахом, осадок отсутствует		
2	Плотность при 20°C (ρ), г/см ³		1,08	1,09	1,1
3	Концентрация водородных ионов (pH) при 20°C.		9,2-9,3		
4	Химический состав, содержание г/литр, (%).				
4.1	Карбонат аммония	$m((NH_4)_2CO_3)$	286 (26,5)	305 (28)	319 (29)
4.2	Вода	$m(H_2O)_{\text{экс.}}$	796(73,7)	787 (72,2)	780 (71)
		$m(H_2O)_{\text{связ.}}$	54 (5,0)	57 (5,2)	60 (5,5)
		$m(H_2O)_{\text{свободн.}}$	742(68,7)	730 (67)	720 (65,5)
4.3	Органические вещества	$m_{\text{орг.в.}}$ (расч.)	52 (4,8)	55(5,0)	61(5,5)
		$m_{\text{орг.в.}}$ (эксп.)	80 (7,4)	82 (7,5)	83 (7,5)
4.4	«Общий» азот органических веществ, % от массы АСД-2Ф		1,32	1,34	1,34

Как видно из данных таблицы 1, для диапазона плотностей серийных образцов 1,08-1,1 г/см³, основную часть препарата составляет вода, содержание которой находится в диапазоне (для «свободной» воды) 720–742 г/л, или 65,5–68,7 % соответственно. Также незначительно изменяется и содержание основного неорганического компонента препарата – карбоната аммония – от 286 до 319 г/л или 26,5-29 % соответственно. Полагая, что карбонат аммония не обладает заметным собственным лечебным эффектом, можно считать, что действие препарата обеспечивается органическими веществами, количество которых находится, согласно двум предпринятым способам оценки, в диапазоне концентраций 52-83 г/л или 4,8–7,5 %.

При формировании групп из 121 органических веществ, обнаруженных при хроматографировании препарата АСД-2Ф, принимали во внимание вещества, сходные по составу, суммарное содержание которых составляло не менее 1 % относительно массы органических соединений. В результате обработки сформированы 7 основных групп из 79 веществ и выделены 5 индивидуальных веществ, суммарное содержание которых составляло 95 % от всех органических веществ.

Результаты обобщения данных хромато–масс–спектрометрии препарата АСД-2Ф представлены на рисунке:

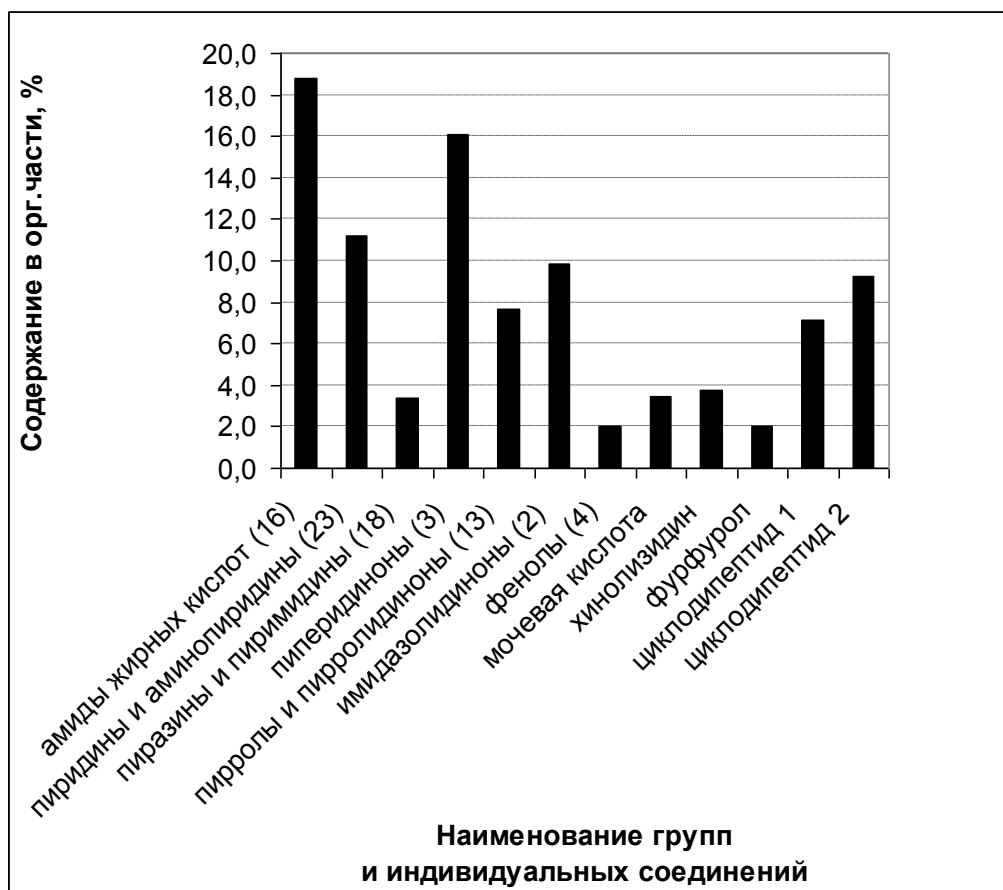


Рис. 1. Химический состав органической части препарата АСД-2Ф

Первая группа соединений с суммарной долей 18,8 % массы органических веществ может быть составлена из 16 амидов низших насыщенных карбоновых кислот, являющихся прямыми продуктами термического распада белков в температурном диапазоне производства АСД-2Ф.

Пять групп веществ могут быть сформированы из азотсодержащих гетероциклических соединений с одним или двумя атомами азота. Суммарная доля азотсодержащих гетероциклических соединений среди органических веществ иной структуры составляет 38,4 %.

Известно, что данные соединения широчайшим образом представлены в качестве структурных фрагментов биологически активных веществ, витаминов, антибактериальных веществ, некоторые из них обладают собственной биологической активностью.

Следует отметить, что среди веществ, отнесённых к группам гетероциклических соединений, некоторые вполне могут претендовать и на отдельное рассмотрение из-за их высоких концентраций, составляющих иногда от 30 до 95 % от суммарной концентрации всей группы.

Например, в группе шестичленных гетероциклических соединений с одним атомом азота в цикле, составленной из 23 аминопиридинов и пиридинов (11 %), максимальную концентрацию имели такие вещества, как 2-аминопиридин (3,4 %), 3-метил-2-аминопиридин (2,2 %), пиколинамид (1,8 %), всего 7,4 %.

В группе пирразины и пиримидины (3 %) наибольшее содержание имели: метилпирразин (0,8 %, Т. кип. = 135 °С), 2, 3-диметилпирразин (0,9 %, Т. кип.= 156°С), триметилпирразин (0,5 %, Т. кип.= 171-172°С), всего 2,2 %.

Вещества группы пирразинов и пиримидинов входят в состав нуклеиновых оснований, нуклеозидов, нуклеотидов, нуклеиновых кислот, играют важную биологическую роль.

Группа пиперидиноны (16,1 %) практически представлена одним соединением: 2-пиперидон, или δ-валеролактан (15,7 %, Т.кип.=256°С). Производные 2-пиперидона предложены в качестве антагонистов простагландинов. В группе пирролидинонов (6,5 %) наибольшее содержание имеет 2-пирролидон (5 %, Т. кип. = 245°С). Пирролидоновый цикл входит в структуру ноотропных препаратов рацетамовой группы, водорастворимого полимера поливинилпирролидона – носителя различных фармацевтических средств.

Имидазолидиноны включают два вещества: 5,5-диметилгидантоин (6,3 %, Т. пл.=174-178°С) и dl-5-этил-5 метил-2,4-имидазолидинон (3,6 %, Т.пл. = 144-150°С). Фенолы (2 %), широко известные, как антисептики, представлены группой из пяти веществ, в том числе 4-гидрокси-фенилфосфониевой кислотой.

Среди индивидуальных органических соединений, содержащихся в препарате АСД-2Ф, привлекает внимание 1, 3, 4, 6, 7, 9а-гексагидро-2Н-хинолизидин (3,7 %, Т. кип. = 298°С), имеющий строение бициклического ненасыщенного азотсодержащего гетероцикла. Хинолизидин является структурным фрагментом биологически активных алкалоидов, таких как цитизин, пахикарпин, спартеин. Производные хинолизидина синтезируются в живых организмах из аминокислоты лизина.

При хроматографировании найдены также прямые продукты расщепления белковой цепи: циклические дипептиды, условно обозначенные на рис. 1 как циклодипептид 1 (гексагидро-3-(2-метилпропил)-пирроло-[1, 2-а]-пиазин-1, 4-дион, или Cyclo-Leu-Pro-дикето-пиперазин, Т. пл. = 163-165° С) и циклодипептид 2 (5, 10-диэтокси-2, 3, 7, 8-тетрагидро-1Н,6Н-дипирроло [1, 2-а; 1', 2'-d] пиазин или этиловый эфир Cyclo-Pro-Pro-дикето-2,5-пиперазина Т. пл. = 180° С) с содержанием в органической части АСД, равным 7,2 % и 9,2 % соответственно.

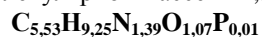
Известно [9], что дикетопиперазины (циклические дипептиды) ингибируют продукцию афлатоксина и обладают антимикробными свойствами, кроме этого данные соединения могут обладать анксиолитической и антидепрессивной активностью. Обсуждается и их антираковое действие [12].

Такие вещества, как нитрилы и изонитрилы, тиазолы, аминокислота валин также обнаружены в хроматограмме, но имеют весьма незначительные по сравнению с другими соединениями, концентрации. Поэтому в рамках данного исследования они не рассматривались.

Для всех остальных, выделенных нами групп веществ, рассчитана (по формулам среднего статистического) средняя молекулярная масса и молекулярная формула органической части препарата АСД-2Ф.

$$\mu_{\text{ср.}} = \sum \omega_i / \sum (\omega_i / \mu_i) = 112,5 \text{ г/моль.}$$

Полученная усредненная формула органической части АСД-2Ф, соответствующая средней молекулярной массе 112,5 г/моль, имеет вид:



Эта формула соответствует элементному анализу органической части препарата: 58,99 % С, 8,22 % Н, 17,75 % N. Поскольку содержание органических веществ является важной характеристикой препарата, то анализ «общего азота» (%N_{эксп.}) органической части АСД-2Ф (см. строку 4.4 в таблице) может быть использован для расчета этой характеристики:

$$m_{\text{орг. в-в}} = 10p \text{ к } (\%N_{\text{эксп.}}).$$

Коэффициент пересчета к, входящий в формулу согласно приведенному элементному анализу $k = 100/17,75 = 5,63$.

Таким образом, в результате анализа собственных и литературных данных нами обоснован следующий состав препарата АСД-2Ф для плотности субстанции в диапазоне 1,08-1,1г/см³:

- вода «свободная» - 720-742 г/литр (65,5-68,7 %);
- карбонат аммония - 286-320 г/литр (26,5-29 %);
- органические вещества – 52-83 г/литр (4,8-7,5 %).

В данной работе предложены общедоступные экспериментальные методики определения обобщенных показателей химического состава препарата АСД-2Ф, позволяющие оперативно и достоверно определять показатели качества препарата.

Показано, что органическая часть препарата содержит значительное количество (около 100) веществ, являющихся структурными фрагментами биологически активных веществ, витаминов, антибактериальных веществ, а также обладающих собственным лечебным действием. Не менее 50 % органических веществ составляют гетероциклические азотсодержащие вещества с одним или двумя атомами азота: аминопиридины и пиридины; пиазины и пиримидины, пиперидиноны, пирролидиноны, имидазолидиноны. Среди гетероциклических соединений наибольший интерес могут представлять: хинолизидин (1, 3, 4, 6, 7, 9а-гексагидро-2Н-хинолизидин) с содержанием в органической части 3,7 % и циклические дипептиды Cyclo-Leu-Pro-дикетопиперазин (7,2 %) и этиловый эфир Cyclo-Pro-Pro-дикето-2,5- пиперазина (9,2 %), обладающие, предположительно, антираковым действием.

Литература

1. Николаев А. В. О химическом составе и новых фракциях препарата АСД. // Труды ВИЭВ. 1959. Т. 22. С. 317-326.
2. Дерябина З. И. Химико-фармакологическая характеристика препарата АСД. // Труды ВИЭВ. 1963. Т. 25. С. 326-339.
3. Абдрахманов В. И., Кирюткин Г. В., Жукова В. В., Краснов В. Л. Утилизация отходов переработки белкового сырья. // Труды НГТУ. Химическая и пищевая промышленность: современные задачи техники, технологии, автоматизации, экономики. 2004. Т. 45. С. 67-68.
4. Абрамов В. Е., Абдрахманов В. И., Дорогова О. А., Кирюткин Г. В., Краснов В. Л. Определение показателей качества препарата АСД-2. // Ветеринария. 2004. № 9, С. 13-15.
5. Абдрахманов В. И., Дорогова О. А., Кирюткин Г. В., Краснов В. Л. Сравнение показателей качества препарата АСД-2Ф, производимого ООО «Ареал-Медикал» и ФГУП «Армавирская биофабрика». // Зооиндустрия. 2005. № 1. С. 5.

6. *Абрамов В. Е., Кугелева Т. И., Сироткина В. П., Касперович В. П.* Показатели качества субстанции АСД-2Ф. // *Ветеринария*. 2010. № 2. С. 42-44.
7. *Абдрахманов В. И., Сахипов В. Р., Краснов В. Л., Сулимов А. В.* Титрование препарата АСД-2Ф. // *Проблемы современной науки и образования*. - 2015. № 4 (34). С. 38-45.
8. Пат. РФ № 2494750 от 10.10.2013. Способ получения стабилизированной формы антисептика-стимулятора Дорогова - фракции 2 (АСД-2).
9. *Лапинская Е. С.* Аминокислоты и циклические дипептиды в настойках гомеопатических матричных URTRICA DIOCA L. и URTRICA URENS L. // *Химико-фармацевтический журнал*. Т. 42. 2008. № 11. с. 49-52.
10. ГОСТ 32055-2013. Нефтепродукты и материалы битумные. Определение содержания воды с помощью перегонки.
11. ГОСТ 13496.4-93. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения азота и содержания сырого протеина.
12. *Sai Lakshman Mithun. C. S. V. Ramachandra Rao.* Isolation and Molecular Characterization of Anti-Cancerous Compounds Producing Marine Bacteria by Using 16S rRNA Sequencing and GC-MS Techniques. // *International Journal of Modern Engineering Research (IJMER)*. 2012. V. 2. № 6. P. 4510-2515.