

УДК 615.9

ББК 52.84

К – 27

Карташов Владимир Антонович, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармациии фармацевтического факультета медицинского института Майкопского государственного технологического университета, т.:(8772)521994;

Чернова Лариса Владимировна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармациии фармацевтического факультета медицинского института Майкопского государственного технологического университета, т.:(8772)521994.

НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ МЕТАБОЛИТОВ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ.

(рецензирована)

Токсические вещества, попадая в организм человека, подвергаются различным превращениям, в результате которых изменяются их химическая структура и физико-химические свойства. Это, в свою очередь, определяет выбор иной схемы выделения метаболитов из биологических объектов по сравнению с выделением нативных веществ. Проведен анализ данных отечественной литературы по выделению метаболитов некоторых токсических веществ при химико-токсикологических исследованиях.

Ключевые слова: токсические вещества, биологические объекты, метаболиты, способы выделения, нативные вещества, химико-токсикологический анализ.

***Kartashov Vladimir Antonovich**, Doctor of Pharmacy, professor of the chair of pharmacy, pharmaceutical faculty of Medical Institute of Maikop State Technological University, tel.: (8772)521994;*

***Chernova Larisa Vladimirovna**, Cand. of Pharmacy, senior lecturer of the chair of pharmacy, pharmaceutical faculty of Medical Institute of Maikop State Technological University, tel.: (8772)521994.*

SOME PROBLEMS OF ISOLATION FROM BIOLOGICAL OBJECTS OF METABOLITES OF TOXIC SUBSTANCES

Toxic substances when penetrating into human's organism undertake various transformations. As a result their chemical structure and physical and chemical features are changing. It determines choice of another scheme of metabolites isolation from biological objects comparing with isolation of native substances.

The authors of the article analyzed Russian literature to single out metabolites of some toxic substances in chemical toxicological researches.

Keywords: toxic substances, biological objects, metabolites, ways of isolation, native substances, chemical toxicological analysis.

Большинство методов химико – токсикологического анализа (ХТА) основано на выделении из биологических объектов и определении неизменных (нативных) токсических веществ. Однако известно, что практически все ксенобиотики, в том числе токсические вещества, попадая в организм, подвергаются различным превращениям – метаболизму (биотрансформации). В результате метаболизма происходит изменение химической структуры токсических веществ, их физико-химических свойств, что определяет выбор иной схемы изолирования метаболитов из биоматериала и их ХТА по сравнению с методами исследования нативных веществ.

На протяжении ряда лет, особенно в последние годы с применением в ХТА высокочувствительных и специфических методов, изучаются различные теоретические и практические вопросы метаболизма токсических веществ, в частности, методы их выделения и определения при исследовании биологических объектов, разрабатываются методики определения токсических веществ по их метаболитам и продуктам гидролиза [1,2,3,4].

Это связано с тем, что многие токсические вещества в организме интенсивно подвергаются процессам биотрансформации и часто не могут быть обнаружены в биологических объектах в неизменном виде. С другой стороны, метаболиты токсических веществ часто являются более

устойчивыми и реакционноспособными, более длительное время сохраняются в биологическом материале по сравнению с нативными веществами и, кроме того, концентрации некоторых метаболитов в объектах исследования в ряде случаев превышают концентрации нативных веществ.

Метаболизм является неотъемлемой частью выведения токсических веществ из организма. Ионизированные и полярные соединения выводятся, как правило, в неизменной форме, а метаболизму в той или иной степени подвергаются гидрофобные (липофильные) вещества. Биотрансформация чаще всего протекает в две фазы. В первой фазе биотрансформации (метаболическая трансформация) происходит химическая перестройка структуры токсических веществ путем биохимических процессов окисления, восстановления, гидролиза с образованием функциональных групп. Вторая фаза биотрансформации – синтез (конъюгация) – взаимодействие токсических веществ или продуктов их метаболической трансформации с естественно содержащимися в организме соединениями с образованием конъюгатов. Обычно конъюгации предшествуют реакции первой фазы биотрансформации. Однако некоторые токсические вещества (фенолы, ароматические карбоновые кислоты и др.) могут сразу вступать во вторую фазу биотрансформации и, наоборот, реакциям первой фазы (например, гидролизу) подвергаются конъюгаты.

Большинство токсических веществ метаболизируется в органеллах гепатоцитов: микросомах, митохондриях, гиалоплазме, содержащих ряд ферментных систем, которые катализируют различные биохимические реакции. В результате метаболизма образуются, как правило, менее токсичные соединения, однако такие превращения как бензонал → фенобарбитал, паратион → параоксон, метафос → метаксон, кодеин → норкодеин, ртуть → метилртуть и некоторые др. приводят к появлению более токсичных метаболитов по сравнению с нативными веществами. Это необходимо учитывать в ХТА при комбинированных отравлениях смесями, содержащими названные выше и некоторые другие вещества. Токсические вещества органической природы, попадая в организм, подвергаются самым разнообразным превращениям. Чаще всего образуется гидрофильные метаболиты наряду с метаболитами, которые практически не отличаются от нативных веществ по своим кислотно-основным и гидрофильно-гидрофобным свойствам. Некоторые ядовитые и сильнодействующие вещества, особенно интенсивно подвергающиеся метаболизму, могут быть не обнаружены при ХТА. Поэтому определение метаболитов токсических веществ с известными параметрами может служить доказательством отравления нативными веществами.

В результате метаболизма образуются такие гидрофильные соединения токсических веществ как спирты, фенолы, карбоновые кислоты, N - оксиды, глюкуроны и др. В химико-токсикологической практике это имеет важное значение. Во-первых, гидрофильные метаболиты лучше растворяются в водных системах организма и быстрее экскретируются. Величина рКа метаболитов чаще всего меньше, они легче ионизируются при физиологических значениях рН, а повышение кислотности также облегчает их экскрецию канальцевым эпителием почек. Это может быть использовано при интерпретации результатов ХТА. Во-вторых, гидрофильные метаболиты токсических веществ, особенно конъюгаты, хорошо растворяясь в воде, не могут быть изолированы по общему ходу ХТА: они практически полностью теряются при прямом экстрагировании органическими растворителями из тканей внутренних органов, не могут быть выделены из водных растворов путем экстракции органическими растворителями и требуют иных способов очистки. Поэтому в химико-токсикологической практике подбирают особые условия для изолирования гидрофильных метаболитов. Например, конъюгаты разрушают путем проведения кислотного, щелочного или ферментативного гидролиза. В результате образуются менее полярные или нативные токсические соединения, которые могут быть исследованы по общему ходу анализа. Так, разработана специальная методика выделения и определения морфина в биологических объектах, включающая проведение кислотного гидролиза его конъюгатов [5, 6]. Некоторые токсические вещества, продукты биотрансформации (гидролиза), которых являются более реакционноспособными соединениями по сравнению с нативными предварительно подвергают гидролизу. Так, одним из вариантов ХТА при отравлении производными 1,4-бензодиазепина является обнаружение и определение продуктов их кислотного гидролиза – бензофенонов, например [7].

Описаны методики экстракционного выделения и обнаружения в трупном материале и биологических жидкостях новокаина и продукта его гидролиза – п-аминобензойной кислоты [8,9]. Авторы [1] предложили использовать солянокислый гидролиз тканей внутренних органов для последующего определения в гидролизате ряда лекарственных и наркотических веществ, не подвергающиеся в процессе гидролиза деструкции, и установили, что степень изолирования исследуемых веществ при этом была выше по сравнению с другими методами.

При изолировании аконитина из трупного материала с помощью амфифильного растворителя (этанола) были выделены его метаболиты – бензоилаконин и аконин – установлены их ТСХ-параметры [10]. Предложена методика ХТА амидопирина и его главных метаболитов – 4-аминоантипирина и 4-ацетиламиноантипирина [11,12]. Показано [13], что бензонал и бензобамил при контакте с органами трупа подвергаются гидролизу с образованием бензойной кислоты, фенобарбитала и барбамила, определение которых может служить косвенным доказательством отравления нативными веществами. Разработан способ идентификации во внутренних органах и биологических жидкостях [14] метаболитов изониазида и салюзиды – гидразина, ацетилизониазида, изоникотиновой и опиановой кислот. Выполнены работы [15, 16, 17] по химико-токсикологическому исследованию продуктов метаболизма – N – ацетилпроизводных стрептоцида, норсульфазола, этазола, сульфамонетоксина, сульфалена. Чувствительность и специфичность обнаружения некоторых N-ацилпроизводных фенотиазина по продукту их щелочного гидролиза – фенотиазину с помощью реакции окрашивания и УФ-спектрофотометрического метода были значительно выше по сравнению с обнаружением нативных веществ [18, 19, 20]. Разработан более простой и точный метод изолирования с помощью этанола и определения сапонинов полиспонина, по конечному продукту метаболизма сапонинов – диосгенину, который получали при кислотном гидролизе спиртовых экстрактов из биологического материала, содержащих сапонины и их промежуточные продукты метаболизма [21]. Обнаружение и определение гликоалкалоида соланина рекомендуется [22] проводить по продукту его гидролиза – агликону соланидину. Авторы [23] описали методику обнаружения и количественного определения ацетонитрила в трупном материале по продукту кислотного гидролиза – уксусной кислоте.

Отмечено, что при контакте с трупной печенью токсические вещества в течение определенного времени подвергаются трансформации. Так, авторы [24] показали, что в трупном материале, к которому предварительно был добавлен пестицид байтан, при хранении объектов при температуре 16-18°C кроме нативного вещества обнаруживался продукт его метаболизма – байлетон. В биологическом материале, содержащем диазепам, через год после захоронения были обнаружены только метаболиты – бензофеноны, причем не только диазепам, но и хлордиазепоксида [25]. Алкилдинитрофенольные соединения практически сразу метаболизируются и после гибели животных в трупном материале обнаруживались только их метаболиты [26, 27].

Основным метаболитом героина является 6-моноацетилморфин (6- МАМ), который является «маркером» употребления героина, в отличие от употребления морфина и кодеина. Однако, 6-МАМ отличается по своим свойствам от нативного вещества (является амфолитом), что необходимо учитывать при его выделении из биологических объектов. Авторы [28] привели данные по специфичности определения некоторых метаболитов 1,4-бензодиазепинов – норхлордиазепоксида, демоксепам, бензофенонов – методом поляризационного флюороиммуноанализа. Факт употребления одного из производных метилендиоксиамфетамина – МДЕА – может быть установлен по обнаружению его основного метаболита – 4-гидрокси-3-метоксиэтиламфетамина, который сохраняется в моче более длительное время по сравнению с нативными веществами [29].

Метаболит фенциклидина - 5-N-(1-фенилциклогексил)-амино- валериановая кислота - в ряде случаев превышает концентрацию фенциклидина в моче. Поэтому для установления факта употребления фенциклидина авторы [30] рекомендуют определять в моче указанный метаболит. Описана методика ХТА метаболитов трамадола [31], в частности, O- и O- и N-дезметилированных продуктов, которые по своим свойствам отличаются от трамадола и для которых, как метаболитов с амфотерными свойствами, подобраны специальные условия изолирования из мочи. Авторами [32] при исследовании мочи методом ГХ/МС обнаружено пять ранее неописанных метаболитов трамадола, определены ГХ-параметры их ацетилированных производных, предложены схемы биотрансформации трамадола. Если в результате ХТА наряду с нативными веществами удалось

количественно определить его метаболит(ты), то, рассчитав отношение концентраций нативного вещества и его метаболита(ов) можно в ряде случаев ориентировочно установить время наступления смерти или дифференцировать острое и хроническое отравление (например, по соотношению морфин-3-глюкуронид/морфин, или морфин-6-глюкуронид/морфин).

Необходимо отметить, что выделение и анализ метаболитов токсических веществ в практике химико-токсикологических лабораторий связан с определенными трудностями: не полностью изучены процессы биотрансформации многих веществ и установлены химические структуры их метаболитов, недостаточно разработаны методики и способы выделения метаболитов токсических веществ из биологических объектов, многие отечественные химико-токсикологические лаборатории не имеют стандартных образцов метаболитов токсических веществ.

Таким образом, краткий анализ отечественной литературы показал, что в настоящее время применяется ряд методик ХТА метаболитов некоторых токсических веществ. Несмотря на это, разработка способов изолирования, обнаружения и количественного определения метаболитов токсических веществ является актуальной задачей, так как определение метаболитов в биологических объектах в ряде случаев имеет преимущества, а иногда является единственно возможным способом доказательства отравления нативными веществами.

Литература:

1. Изолирование и определение различных наркотических и лекарственных веществ после кислотного гидролиза биологического материала / Барцев А.И. [и др.] // Судебно-мед. экспертиза. 1998. № 6. С. 26-27.
2. Лакин К.М., Крылов Ю.Ф. Биотрансформация лекарственных веществ. М.: Медицина, 1981. 344 с.
3. Парк Д.В. Биохимия чужеродных соединений. М.: Медицина, 1973. 297с.
4. Хирц Ж. Аналитические методы исследования метаболизма лекарственных средств. М.: Медицина, 1975. 272с.
5. Информационное письмо об определении морфина при судебно-химическом исследовании трупного материала. М., 1991.
6. Химико-токсикологический анализ веществ, вызывающих одурманивание: метод. указания. М., 1989. С. 60-63.
7. Определение нитразепама и его метаболитов в трупном материале: метод. рекомендации. М., 1988. 16 с.
8. Песахович Л.В. Вопросы химико-токсикологического доказательства новокаина // Современ. методы исслед. судебно- мед. объектов. Рига, 1979. С. 90-93.
9. Садыков З.К., Икрамов Л.Т. Обнаружение новокаина и п-аминобензойной кислоты в трупном материале // Судебно-мед. экспертиза. 1990. № 4. С. 32-34.
10. Методические указания об определении аконитина при судебно – химическом исследовании биологического материала. М., 1976. 16с.
11. Информационное письмо об определении амидопирина при химико-токсикологических исследованиях. М., 1994. 11с.
12. Хомов Ю.А., Кокшарова Н.В. Обнаружение и определение амидопирина и его главных метаболитов в одной пробе мочи // Современ. проблемы допинг-контроля в спорте. М., 1985. С. 193-196 с.
13. Чернобровина Т.А. Исследование N-бензоил-барбитуратов в объектах химико-токсикологического анализа: автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук. Пятигорск, 1989. 13 с.
14. Обнаружение метаболитов тубазида и салюзиды во внутренних органах и биологических жидкостях / А.Ф. Фартушный [и др.] // Судебно- мед. экспертиза. 1990. № 4. С. 30-31.
15. Вишневецкий И.В. Судебно-химическое исследование сульфамонетоксина: автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук, М., 1990. 24с.
16. Плехов С.В. Химико-токсикологическое исследование стрептоцида, норсульфазола и этазола: автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук. М., 1990. 25с.
17. Шевцова М.В. Химико-токсикологическое исследование сульфалена: автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук. М., 1990. 21с.

18. Егоров А.П. Обнаружение 10-ацилпроизводных фенотиазина реакциями окрашивания и методов спектрофотометрии по продуктам их гидролиза // Судебно-мед. экспертиза. 1998. №1. С. 29-31.
19. Егоров А.П. Разделение 10-алкилпроизводных и продуктов гидролиза 10-ацилпроизводных фенотиазина методом экстракции // Там же. № 3. С. 23-24.
20. Егоров. А.П., Саломатин Е.М. Определение нонахлазина в трупном материале // Некоторые вопросы химико-токсикол. анализа: сб. науч. тр. Барнаул, 1989. С. 7-10.
21. Химико-токсикологическое исследование полиспонина / Г.Б. Искандеров [и др.] // Современные проблемы допинг-контроля в спорте. С. 55-60.
22. Методические указания об определении соланина в трупном материале. М., 1982. 19 с.
23. Яблочкин В.Д., Мизелева Е.С. Судебно-химическое исследование трупного материала на ацетонитрил // Судебно-мед. экспертиза. 2001. №4. С. 37-39.
24. Шорманов В.К., Маркелов И.Ю. Сохраняемость байтана и байлетона в трупном материале // Там же. 1996. №4. С. 43-45.
25. Кругов М.И. Сохраняемость продуктов распада сибазона в трупах экспериментальных животных // Там же. 1998. № 3. С. 24-27.
26. Шорманов В.К., Нестерова А.В. Особенности распределения алкилдинитрофенольных соединений в трупном материале // Фармация. 1991. №3. С. 42-45.
27. Шорманов В.К., Нестерова А.В. Сохраняемость некоторых алкилдинитрофенольных соединений в трупном материале // Судебно-мед. экспертиза. 1992. №4. С. 35-37.
28. Обнаружение производных 1,4-бензодиазепина в тканях печени иммунохимическими методами / С.Б. Лисовская [и др.] // Там же. 2001. № 1. С. 20-25.
29. Анализ метилendioксипроизводных амфетамина / Н.В. Веселовская [и др.]// Там же. 1999. №3. С. 23-30.
30. Веселовская Н.В., Савчук С.А., Изотов Б.Н. Хроматографический анализ фенциклидина, его метаболитов и аналогов в биологических жидкостях // Там же . №2. С. 20-25.
31. Обнаружение трамадола и его метаболитов в моче хроматографическими методами / Н.В. Веселовская [и др.] // Там же. №4. С. 38-43.
32. Мелентьев А.Б., Ким Д.Г. Идентификация метаболитов трамадола в виде их ацетилированных производных методом газовой хроматографии с масс селективным детектором // Изв. Челяб. науч. центра. 2003. Вып. 1. С. 98-103.