

УДК [543.544.3:576.3]:[577.121:615.9:541.4]

Газохроматографический анализ биологических проб. Определение метаболитов токсичных химикатов

И. В. Рыбальченко, Н. С. Хлебникова, Е. И. Савельева, А. С. Радилов, В. Р. Рембовский

ИГОРЬ ВЛАДИМИРОВИЧ РЫБАЛЬЧЕНКО — доктор химических наук, профессор Военной академии радиационной, химической и биологической защиты. Область научных интересов: аналитическая химия высокотоксичных соединений.

105005 Москва, Бригадирский переулок, 13, тел./факс (095)777-12-07, E-mail riv@lumex.ru

НАТАЛИЯ СЕМЕНОВНА ХЛЕБНИКОВА — кандидат химических наук, старший научный сотрудник ФГУП НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека(НИИГПЭЧ). Область научных интересов: хромато-масс-спектрометрия.

ЕЛЕНА ИГОРЕВНА САВЕЛЬЕВА — кандидат химических наук, старший научный сотрудник НИИГПЭЧ. Область научных интересов: хромато-масс-спектрометрия, газовая хроматография.

АНДРЕЙ СТАНИСЛАВОВИЧ РАДИЛОВ — доктор медицинских наук, заместитель директора НИИГПЭЧ по научной работе. Область научных интересов: токсикология.

ВЛАДИМИР РОМАНОВИЧ РЕМБОВСКИЙ — доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, директор НИИГПЭЧ. Область научных интересов: токсикология, биохимия.

188663, Ленинградская обл., п/о Кузьмоловский, НИИГПЭЧ, тел. (812)534-92-16, (812)534-90-28, факс (812)70-93-506, E-mail gipeh@lens.spb.ru

Введение

К международной Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении присоединились 167 стран, однако опасность применения этого средства массового поражения в локальных конфликтах и при террористических актах сохраняется. Подтверждением тому служат события последних десятилетий: использование боевых отравляющих веществ в ходе Ирано—Иракской войны, применение нервно-паралитических веществ в Ираке против курдского населения, несколько инцидентов с химическими атаками в ходе террористических актов в Японии. Не может быть исключена вероятность воздействия сублетальных доз компонентов химического оружия (ХО) на персонал, занятый в предусмотренных Конвенцией мероприятиях по его уничтожению, конверсии бывших производств, инспектированию контролируемых по Конвенции объектов и т.д. Все это обуславливает актуальность создания надежных методов анализа, позволяющих выявлять факты и контролировать степень интоксикации организма после воздействия токсичных химикатов (ТХ)*.

* Согласно Конвенции, под термином «Токсичный химикат» понимается любой химикат, который за счет своего химического воздействия на жизненные процессы может вызвать летальный исход, временный инкапацирующий эффект или причинить постоянный вред человеку или животным. Для цели осуществления Конвенции токсичные химикаты, подлежащие контролю, перечислены в списках, содержащихся в Приложении по химикатам. Список 1 включает основные боевые отравляющие вещества (фосфорорганические, иприты, люизиты), продукты метаболизма которых рассматриваются в настоящей статье.

Методы определения ТХ в объектах окружающей среды и в технологических средах достаточно хорошо отработаны в виде стандартных операционных процедур и освоены лабораториями, аккредитованными международной Организацией по запрещению химического оружия [1, 2]. В то же время определение ТХ и их метаболитов в биологических пробах представляет собой значительно более сложную задачу, а методы, пригодные для ее решения, начали активно исследовать только в последние годы.

Практическая значимость этих методов обусловлена тем, что они, в отличие от анализа объектов окружающей среды, где ТХ подвергаются быстрому разложению, позволяют реализовать так называемый «ретроспективный» анализ, обеспечивающий получение необходимых данных спустя длительное время с момента интоксикации организма. Предполагается, что ретроспективный метод определения метаболитов ТХ в биопробах позволит получать важную информацию, доказывающую факты интоксикации и ее степень в случаях применения ХО в локальных конфликтах и при террористических актах, а также при осуществлении здравоохранительных мероприятий по отношению к персоналу, занятому в работах на объектах по уничтожению ХО и их инспектированию.

Основные проблемы определения ТХ в биологических средах

Обнаружение, идентификация и оценка количественного содержания ТХ и их метаболитов в биологических образцах относятся к числу наиболее сложных задач аналитической химии. При разработке стратегии анализа следует учитывать необходимость решения ряда проблем.

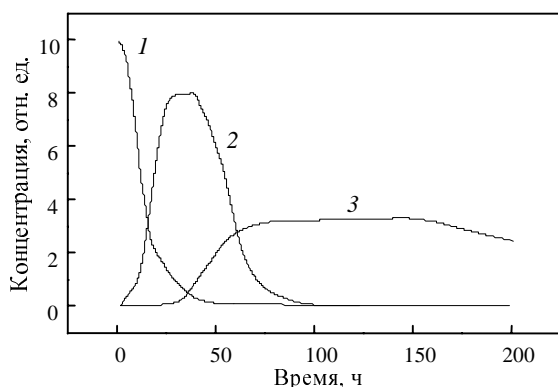


Рисунок. Примерная токсикокинетика метаболитов ТХ в крови:

1 — токсичные химикаты; 2 — продукты деградации ТХ; 3 — аддукты

Определение самих ТХ в биопробах практически невозможно в связи с их быстрым метаболизмом в организме (несколько минут после интоксикации), поэтому объектами ретроспективного анализа могут служить более устойчивые продукты деградации ТХ и их аддукты.

В качестве маркеров можно использовать только те химические соединения, присутствие которых в организме однозначно связано с фактом интоксикации тем или иным ТХ. Структура маркеров должна содержать достаточно информации для идентификации действующего вещества.

Способы отбора проб, их хранения и доставки к месту анализа должны быть четко регламентированы. Необходимо строго учитывать время между моментом отбора пробы и предполагаемым моментом интоксикации, поскольку, согласно имеющимся токсикокинетическим данным, концентрации метаболитов ТХ в биосредах также снижаются со временем, что показано на рисунке.

Процедуры подготовки проб к анализу должны обеспечивать наиболее полное извлечение анализируемых веществ из матрицы и отделение их от веществ, мешающих анализу. Объем пробы, взятой для анализа, должен определяться чувствительностью и селективностью последующего инструментального анализа.

Методы инструментального анализа должны обладать высокой чувствительностью и обеспечивать селективное детектирование и структурную идентификацию анализируемых соединений.

Имеющиеся литературные данные по метаболизму и токсикокинетики ТХ немногочисленны и противоречивы. Эти данные накоплены главным образом по результатам клинико-химических обследований пострадавших в инцидентах с ТХ (применение иприта в Ирано—Иракском конфликте, применение зарина в Мацумото и Токио, вещества VX в Осаке и т.д.).

Определение маркеров ТХ

В соответствии с двумя формами существования метаболитов ТХ в организме, а именно, ковалентных

аддуктов с белками и свободных продуктов гидролиза, существует два основных подхода к установлению факта воздействия ТХ на живые организмы через обнаружение в биосредах специфических продуктов их метаболизма ТХ (маркеров). При реализации первого подхода в качестве маркеров используют или сами аддукты, или продукты, выделяемые из аддуктов с помощью той или иной химической обработки. Непосредственной идентификации ТХ в биосредах в виде их аддуктов с белками посвящено сравнительно небольшое число работ главным образом в связи с тем, что для структурных исследований больших молекул требуется применение таких сложных, дорогостоящих и пока еще мало распространенных инструментальных методов как жидкостная хроматография (ЖХ) в сочетании с тандемной масс-спектрометрией и масс-спектрометрией с лазерной десорбцией и ионизацией [3]. Методы идентификации ТХ в биосредах по продуктам разложения их аддуктов получили значительно большее распространение в связи с тем, что для анализа продуктов разложения, являющихся низкомолекулярными соединениями, могут быть использованы газовая хроматография (ГХ) и газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС), ставшие в настоящее время общепринятыми и доступными средствами аналитической химии.

Полхиус и др. [4] идентифицировали зарин в образцах сыворотки крови жертв террористических актов в Японии, положив в основу метода анализа реактивацию фосфорилированной бутирилхолинэстеразы фторид-ионами, приводящую к количественному высвобождению фосфорорганического фрагмента. В других ретроспективных исследованиях биосред жертв отравления зарин [5, 6] было проведено выделение и триптинизация аддуктов зарина с ацетилхолинэстеразой из мембран эритроцитов и тканей мозга, очистка аддуктов с помощью иммуноафинной хроматографии с последующим разложением с помощью трипсина и щелочной фосфатазы, выделением продуктов гидролиза зарина (изопропилметилфосфоновой и метилфосфоновой кислот) и их хромато-масс-спектрометрическим анализом в виде соответствующих триметилсилиловых эфиров.

Беншоп с соавторами [7] продемонстрировали возможность установления факта воздействия иприта на организм человека путем иммунохимического анализа N7-гуанинового аддукта в составе ДНК, а также ХМС анализом N-концевого валинового аддукта глобина после его деструкции по методу Эдмана и дериватизации перфтормасляным ангидридом. Лудлум с соавторами [8] использовали ГХ-МС в качестве независимого метода, подтверждающего результаты анализа ДНК-аддуктов иприта в биосредах с помощью жидкостной хроматографии с флуоресцентным детектированием.

Фиддер с соавторами [9] разработали подход к идентификации и оценке степени поражения люизитом путем анализа аддуктов ТХ с гемоглобином. Метод основан на обработке образцов цельной крови или плазмы 2,3-меркаптопропанолом, выделении дитиольного производного 2-хлорвиниларсонистой кислоты, его очистке с помощью твердофазной экстракции, получении гептафторбутирильного производного и его ГХ-МС анализе.

Таблица 1

Метаболиты (маркеры) для установления факта воздействия ТХ на человека и животных

Метаболит	Тип ТХ
Метилфосфоновая кислота (МФК)	Зарин, зоман, VX, российский VX
О-этиловый эфир МФК (ЭМФК)	VX
О-изопропиловый эфир МФК (ИПМФК)	Зарин
О-изобутиловый эфир МФК (ИБМФК)	Российский VX
О-пинаколиловый эфир МФК (ПМФК)	Зоман
Тиодигликоль (ТГ)	Сернистый иприт
Тиодигликоль сульфоксид (ТГС)	То же
2-Хлорвиниларсонистая кислота (ХВАК)	Люзит

Однако процедуры выделения аддуктов ТХ из биосред, их последующего разложения, очистки и анализа продуктов разложения чрезвычайно сложны и индивидуальны не только для каждого ТХ, но и для каждого вида аддуктов одного вещества. Работы, связанные с идентификацией аддуктов, носят в значительной степени поисковый характер.

Объекты анализа определены только для двух ТХ — зарина и сернистого иприта, поиск маркеров для других ТХ из группы фосфорорганических отравляющих веществ (зоман, VX) в настоящее время продолжается, и разработка универсальных подходов в данной области — дело будущего.

Более доступными для анализа в биосредах объектами являются продукты гидролиза ТХ. Это — низкомолекулярные соединения, и все они в виде летучих производных могут быть проанализированы методами ГХ, ГХ-МС и ГХ-МС/МС в режимах электронного удара или химической ионизации. Перечень основных продуктов гидролитического пути метаболизма ТХ в организме человека и животных, которые могут быть использованы в качестве маркеров, приведен в табл. 1.

Особенности анализа биосред

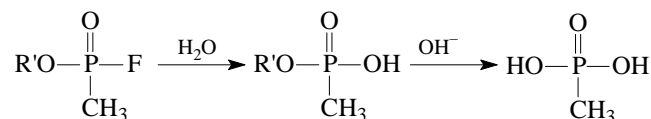
Ключевым звеном в анализе биосред является стадия выделения целевых веществ из матрицы, их очистка от компонентов, мешающих анализу, и концентрирование. Кровь и моча содержат большое количество высоко- и низкомолекулярных полярных и неполярных компонентов (белки, аминокислоты, органические кислоты, спирты, соли), которые создают препятствия как на стадии пробоподготовки, сорбируя целевые вещества при концентрировании и дериватизации и конкурируя за дериватирующий агент, так и на стадии хроматографического анализа в результате перекрытия пиков целевых веществ на хроматограммах. Поэтому в процедурах подготовки проб к

анализу должны быть решены задачи удаления органических и неорганических компонентов матрицы с минимальными потерями целевых веществ.

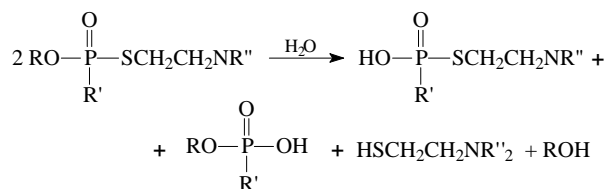
Фосфорорганические токсичные химикаты

Деградация фосфорорганических ТХ протекает по следующим схемам:

О-алкилметилфторфосфонаты (зарин, зоман)



О-алкил-S-2-диалкиламиноэтилалкилтиолфосфонаты (вещество VX)



Несмотря на то, что маркеры этой группы веществ алкилметилфосфоновые кислоты относятся к одному классу органических соединений, универсальная процедура их извлечения из биологических жидкостей и очистки пока не сформировалась. Для определения алкилметилфосфоновых кислот в крови (сыворотке, плазме) и моче в процессе пробоподготовки используют как жидкость-жидкостную экстракцию, так и, главным образом, твердофазную экстракцию на силикагеле, модифицированном октадецильными группами (силикагель-С₁₈), и флорисиле или катион- и анионообменную хроматографию [10–14]. При этом и твердофазная экстракция, и ионообменная хроматография в разных процедурах служат для извлечения целевых веществ и для удерживания примесей. При анализе крови наибольшее внимание уделяют отделению целевых веществ от высокомолекулярных компонентов матрицы, в то время как при анализе мочи — обессоливание образцов.

Сернистый иприт

Разложение иприта происходит по схеме, представленной ниже.

Для идентификации и количественной оценки содержания маркеров сернистого иприта в крови и моче эффективны методики [16, 17], основанные на вытеснении тиодигликоля и его производных из белковых конъюгатов с помощью трихлорида титана,

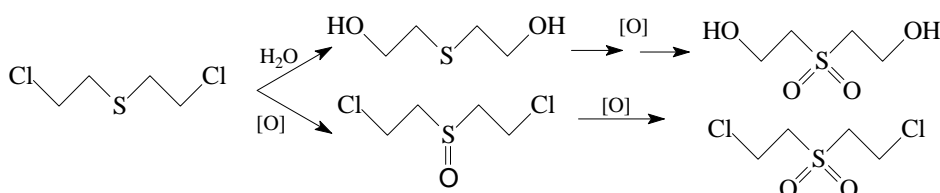


Таблица 2

Процедуры определения маркеров ТХ в биопробах

Маркер	Матрица (объем пробы)	Пробоподготовка	Производное	Метод анализа	Предел обнаружения	Литература
Фосфорорганические ТХ						
ЭМФК	Сыворотка крови (1 мл)	Депротенинизация микроультра-фильтрацией, обработка метилен-хлоридом, экстракция ацетонитри-лом, дериватизация <i>N</i> -метил- <i>N</i> -(<i>трет</i> -бутилдиметилсилил)три-фторацетамидом + 1% <i>трет</i> -бутилдиметилсилилхлорида (MTBSTFA + 1% TBDMSCl)	<i>N</i> -метил- <i>N</i> - <i>трет</i> -бутил-диметилсилиль-ный (ТБДМС) эфир	ГХ-МС-ЭУ ¹⁾ ГХ-МС-ПХИ ²⁾	3 нг/мл	[10]
ИПМФК МФК	Моча (2 мл)	Пропускание последовательно через колонки с силикагелем-С ₁₈ и Dowex в Н ⁺ форме, дериватизация MTBSTFA в присутствии пиридина	ТБДМС эфиры	ГХ-ПФД ³⁾	10 нг/мл	[11]
ЭМФК ИПМФК МФК	Моча (1 мл)	Пропускание через колонку со слоями смолы Dowex в Ag ⁺ , Ва ⁺ и Н ⁺ формах, дериватизация бис(триметилсилил)трифторацетамидом (BSTFA)	Триметилси-лильные (ТМС) эфиры	ГХ-ПФД	25 нг/мл (ЭМФК), 60 нг/мл (МФК)	[12]
МФК ЭМФК ПМФК	Моча (1-5 мл)	Твердофазная микроэкстракция с одновременной дериватизацией MTBSTFA	ТБДМС эфиры	ГХ-МС-ЭУ	0,5 нг/мл (ЭМФК), 10 нг/мл (МФК) 20 нг/мл (ПМФК)	[13]
ЭМФК ИПМФК ПМФК	Сыворотка крови, моча (1 мл)	Экстракция на колонке с силикаге-лем, модифицированным четвер-тичными аммониевыми группами, дериватизация пентафторбензил-бромидом, очистка производных на колонке с флорисилом	Пентафторбен-зильные эфиры (ПФБ)	ГХ-МС-ОХИ ⁴⁾ (метан); ГХ-МС-ОХИ (изобутан) ГХ-МС-МС ⁵⁾ (азот, ксенон)	< 10 нг/мл	[14]
Сернистый иприт						
ТГ	Моча (1 мл)	Ферментативный гидролиз, дерива-тизация ангидридом гептафтормас-ляной кислоты	Бис(гептафторбу-тират	ГХ-МС-ЭУ	5 нг/мл	[15]
ТГ	Плазма крови, моча (1 мл)	Экстракция на картридже ChemElut, очистка на силикагеле-С ₁₈ (плазма) или флорисиле (моча), дериватиза-ция пентафторбензоилхлоридом	Бис(пентафторбе-нзоат)	ГХ-МС-ОХИ (метан)	1 нг/мл	[16]
ТГ+ ТГС (совме- стно в виде ТГ)	Моча (0,5 мл)	Обработка солякислым раствором TiCl ₃ , экстракция на картридже ChemElut, очистка на флорисиле (моча), дериватизация пентафтор-бен-зоилхлоридом	Бис(пентафторбе-нзоат)	ГХ-МС-ОХИ (метан)	1 нг/мл	[17]
Люзит						
ХВАК	Моча (1 мл)	Дериватизация <i>in situ</i> 1,3-пропан-дитиолом, твердофазная микроэк-тракция	2-(2-Хлор-винил)-1,3,2-ди-тиоарсенолин	ГХ-МС-ЭУ	7.4 пг/мл	[18]
ХВАК	Кровь, плазма (2 мл) Моча (4 мл)	Дериватизация <i>in situ</i> 2,3-димер-капто-1-пропанолом, очистка на силикагеле-С ₁₈ , дериватизация гептафторбутирилимидазолом	Гептафторбути-рат 2-(2-хлорви-нил)-4-(гидрок-си-метил)-1,3,2-дитиоарсе-нолина	ГХ-МС-ЭУ	~150 пг/мл (кровь, плаз-ма) ~1,5 нг/мл (моча)	[19]

Примечания. 1) ГХ-МС-ЭУ — газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией с ионизацией электронным ударом. 2) ГХ-МС-ПХИ — газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией с химической ионизацией с регистрацией положительных ионов. 3) ГХ-ПФД — газовая хроматография с пламенно-фотометрическим детектором. 4) ГХ-МС-ОХИ — газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией с химической ионизацией с регистрацией отрицательных ионов. 5) ГХ-МС-МС — газовая хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией.

твердофазной экстракции, концентрировании в растворе этилацетата, дериватизации пентахлорбензоил-хлоридом, реэкстракции деривата в толуол и ГХ-МС анализе в режиме химической ионизации метаном с регистрацией отрицательных ионов.

Люизит

Все предложенные методы анализа основного маркера люизита 2-хлорвиниларсонистой кислоты (ХВАК) в биосредах основаны на ее дериватизации с помощью вицинальных дитиолов [1,2-этандитиола, 1,3-пропандитиола или 1,2-димеркаптопропан-1-ола («британский антилюизит»)] с образованием летучих циклических дисульфидов. Дериватирующий агент добавляется непосредственно в матрицу, после чего полученное производное выделяют и анализируют [18, 19]. Анализ проводят методом ГХ-МС в режиме ионизации электронным ударом с регистрацией ионов.

Обобщенные данные по известным методам анализа продуктов гидролиза как маркеров воздействия ТХ на живой организм, включающие процедуры их извлечения из биологических жидкостей, очистки, дериватизации, а также по методам инструментального анализа и пределам обнаружения приведены в табл. 2.

Заключение

При определении токсичных химикатов в биологических объектах доминирующей является стадия извлечения целевых веществ из матрицы и их концентрирование. В настоящее время наиболее распространенной техникой пробоподготовки является твердофазная экстракция в сочетании с сорбционными и ионообменными процедурами. В последние годы большое внимание уделяется исследованию возможности твердофазной микроэкстракции и других современных подходов к анализу биомаркеров токсичных химикатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Савельева Е.И., Зенкевич И.Г., Кузнецова Т.А., Радилов А.С., Пшеничная Г.В. Рос. Хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И.Менделеева), 2002, № 6, с. 82–91.
2. Рыбальченко И.В. Ядерный контроль, 2001, № 5, с. 56–60.
3. Kientz C.E. J. Chromatogr. A, 1998, v. 814, p. 1–22.
4. Polhuijs M., Langenberg J.P., Benschop H.P. Toxicol Appl. Pharmacol., 1997, v. 146, p. 156.
5. Matsuda Y., Nagao M., Takatori T. e. a. Toxicol. Appl. Pharmacol., 1998, v. 150, p. 310.
6. Nagao M., Takatori T., Matsuda Y. e. a. Ibid., 1997, v. 144, p. 198.
7. Benschop H.P., Van der Schans G.P., Noort D. e. a. J. Anal. Toxicol., 1997, v. 21, p. 249.
8. Ludlum D.B., Austin-Ritche P., Hagopian M., Niu D. Biol. Interact., 1994, v. 91, p. 39.
9. Fidder A., Noort D., Hulst A.G. e. a. Arch. Toxicol., 2000, v. 74, p. 207.
10. Katagi M., Nishikawa M., Tatsuno M., Tsuchihashi H. J. Chromatogr., 1997, v. 689, p. 327.
11. Nakajima T., Sasaki K., Orawa H. e. a. Arch. Toxicol., 1998, v. 72, p. 601.
12. Minami M., Hui D-M, Katsumata M. e. a. J. Chromatogr., 1997, v. 695, p. 234.
13. Tiong M.T., Leow S.Y., Loke W.K. Proc. 2nd Singapore Int. Symp. on Protection against Toxic Chemicals, Singapore, 2000, p. 126.
14. Boniebale E., Debordes L., Coppet L. J. Chromatogr. B, 1996, v. 688, p. 255.
15. Jakubowski E.M. Woodard C.L., Mershon M.M., Dolzine T.W. Ibid., 1990, v. 528, p. 184.
16. Black R.M., Read R.W. Ibid., 1991, v. 558, p. 393.
17. Black, R.M., Read R.W. Ibid., 1988, v. 449, p. 261.
18. Noort D., Hulst A.G., Trap H.C. e. a. Arch. Toxicol., 1998, v.72, p. 671.
19. Rohrbauh D.K., Sarver E.V. J. Chromatogr. A, 1998, v. 809, p. 141.