

**ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЛАЗМЫ
КРОВИ КРЫС ПОДВЕРГАВШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ АЛИФАТИЧЕСКИХ
УГЛЕВОДОРОДОВ С ЧИСЛОМ АТОМОВ УГЛЕРОДА ОТ 1 ДО 5**

Уколов А.И. *, Мигаловская Е.Д., Радилов А.С.

ФГУП «Научно-исследовательский институт

гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России

188663 Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмолловский,

ст. Капитолово, корп. № 93

*E-mail: AntonUkolov@gmail.com.

Резюме: Проведено определение метаболитов пропана, *n*-бутана и изобутана в образцах плазмы крови крыс подвергавшихся их хроническому воздействию. Методами газовой хроматомасс-спектрометрии с твердофазной микроэкстракцией определены ацетон, бутанол-1 и *tert*-бутанол. Метаболиты более тяжелых углеводородов не были выявлены.

Ключевые слова: углеводороды, пропан, бутан, изобутан, ГХ-МС, плазма крови.

**GC-MS-SPME ANALYSIS OF BLOOD PLASMA FROM RATS EXPOSED BY
ALIPHATIC C1-C5 HYDROCARBONS**

A.I. Ukolov*, E.D. Migalovskaya and A.S. Radilov

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology Federal State

Unitary Enterprise, Federal Medical Biological Agency of Russia

Build. 93, Kapitoloovo Station, g/p Kuz'molovsky, Vsevolozhsky District, 188663 Leningrad

Region, Russian Federation

*AntonUkolov@gmail.com

Abstract: A metabolites of propane, butane and isobutane was determined in plasma samples of rats exposed to aliphatic hydrocarbons. Acetone, butanol-1 and *tert*-butanol was determined by GC-MS-SPME. Metabolites of pentane and isopentane have not been identified.

Key words: hydrocarbons, propane, butane, isobutane, GC-MS, SPME, blood plasma.

Введение

С целью оценки опасности смеси предельных углеводородов при длительном поступлении в организм проведен хронический эксперимент. Подопытные животные подвергались ингаляционному непрерывному 90-суточному воздействию смеси предельных углеводородов C₁-C₅ в концентрациях: 1250 ± 51,5 мг/м³ (3 группа), 255,7±15,7

мг/м³ (2 группа), $50,2 \pm 6,1$ мг/м³ (1 группа). Состав смеси приведен в таблице 1. Соотношения компонентов смеси определяются их реальными соотношениями концентраций в воздухе рабочих зон.

Таблица 1 Состав смеси предельных углеводородов, % (масс.)

CH ₄	C ₂ H ₆	C ₃ H ₈	i-C ₄ H ₁₀	n-C ₄ H ₁₀	i-C ₅ H ₁₂	n-C ₅ H ₁₂
23	3	48	7	11	5	3

Таким образом, смесь состоит из метана, этана, пропана, изобутана, *n*-бутана, изопентана и *n*-пентана. Самый легкий представитель смеси, низший гомолог класса алифатических углеводородов – метан, в основном, действует на организм как асфиксant заменяя воздух и снижая парциальное давление кислорода вызывая гипоксию [1, 2]. Показано, что кролики могут дышать смесью метан/кислород в соотношении 4 к 1 в течение длительного промежутка времени без видимых эффектов [3]. Несмотря на это, в работе [5] указано, что небольшие количества метана превращаются в метанол и затем в диоксид углерода. Фармакокинетика метана, возможно, соответствует этану [4].

Токсикокинетика этана во многом аналогична метану, в диапазоне концентраций 0,5-5000 ppm не выявлено значимых эффектов у крыс. Этан выделяется в неизменном виде в выдыхаемом воздухе [4]. Стоит отметить, что этан в выдыхаемом воздухе является естественным метаболитом и маркером перекисного окисления липидов [5]. Превращения экзогенного этана в этанол не происходит в сколько-нибудь значительной степени, ввиду того что этан является плохим субстратом для цитохрома P450. Пропан во многих описанных случаях тоже проявляет себя как асфиксant [6]. В отличие от этана и метана, пропан может метаболизироваться ферментами печени до изопропанола и ацетона. Метаболиты были обнаружены в крови, печени, почках и мозгу экспонированных мышей [7]. Отмечено, что пропан существенно менее токсичен чем «старшие» гомологи – бутан и пр. [4].

n-Бутан может окисляться ферментами печени [8] до бутанола-2, бутанона-2, бутанола-1 [9], 2,3-бутандиола, 3-гидрокси-2-бутанона и 2,3-бутандиона [10]. Изобутан в свою очередь образует *трет*-бутанол. Отмечено, что возможно образование глюкуронидов с бутанолом-2 [4].

n-Пентан хуже растворим в крови, чем гексан и гептан [4]. Пентан хорошо поглощается жировой тканью, а также мозгом, печенью, мышцами, почками, легкими и сердцем. Алифатическое гидроксирование это основной путь метаболизма пентана. Основной метаболит - 2-пентанол (83-89%), 3-пентанол – минорный метаболит (11-16%).

Кетоны и альдегиды не были обнаружены при экспонировании пентаном. Отмечено, что возможно образование глюкуронидов со спиртами. Изопентан, в свою очередь, образует 3-метил-2-бутанол, 2-метил-2-бутанол и 3-метил-2-бутанон [11], 2-метил-1-бутанол и 3-метил-1-бутанол [4].

Цель работы

Комплексный химический мониторинг алифатических углеводородов на экспериментальных животных был проведен с целью установления зависимости между полученной дозой токсиканта и концентрацией его маркеров в биологических образцах.

Материалы и методы

Определение целевых веществ выполняли методом газовой хроматографии масс-спектрометрии (ГХМС) в режиме электронной ионизации. Концентрирование соединений из плазмы крови крыс осуществляли в режиме газовой экстракции при нагревании в замкнутом объеме с последующим разделением на капиллярной колонке и количественным определением по индивидуальным характеристическим ионам.

Исследование равновесной паровой фазы над пробами плазмы крови крыс было проведено при помощи газового хроматомасс-спектрометра Shimadzu QP2010 Plus в режиме автоматической пробоподготовки и введения проб с помощью автодозатор АОС-5000. Концентрирование летучих органических соединений из равновесной паровой фазы проводили на микроволокно карбоксен/полидиметилсилоксан с толщиной пленки неподвижной фазы 85 мкм. Перед началом анализа проб волокно регенерировали в токе азота при 200 °С в течение 30 минут.

Образцы плазмы крови каждой исследуемой группы крыс объединяли таким образом, чтобы полученный объем пулированного образца составлял 3 мл, и помещали в вials объемом 10 мл с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками. Перед отбором паровой фазы проводили термостатирование проб в течение 10 минут при температуре 40 °С. Затем в паровую фазу над пробой вводили микроволокно и проводили концентрирование летучих компонентов паровой фазы в течение 10 минут. По окончании периода сорбции волокно вводили в инжектор хроматографа и проводили термодесорбцию сконцентрированных соединений в хроматографическую колонку в течение 1 минуты. Хроматографическое разделение проводили на капиллярной колонке HP-5MS длиной 60 м с внутренним диаметром 250 мкм и толщиной слоя фазы 0,25 мкм. Начальная температура колонки 40°С (1 мин), затем со скоростью 10 °/мин температуру увеличивали до 280°С и выдерживали колонку при 280°С в течение 35 минут. Температура инжектора составляет 250°С. Температура интерфейса - 280°С. Температура

ионного источника масс-спектрометра - 200°C. Энергия ионизирующих электронов – 70 эВ. Идентификация проводилась в режиме селективного ионного мониторинга ($m/z = 43, 58$ для ацетона, $m/z = 43, 45$ для пропанола-2, $m/z = 59$ для трет-бутанола, $m/z = 43, 72$ для бутанона, $m/z = 74$ для изобутанола, $m/z = 41, 43, 56$ для бутанола-1, $m/z = 43, 58, 71, 86$ для пентанона-2).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью прикладного пакета программ «STATISTICA» (версия 6.0, StatSoft Inc, 2001) и Microsoft Excel 2007 с дополнением Multibase 2014. В случае трех и более выборок различия по анализируемым показателям оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим попарным межгрупповым сравнением величин по критерию Фишера. Для всех видов анализа статистически значимыми по сравнению с контролем считали значения с $p < 0.05$.

Результаты

Результаты определения представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Соединения, идентифицированные в представленных образцах плазмы крови крыс

№ п/ п	m /z	Идентифициро- ванное соединение	Содержание идентифицированных соединений в образцах плазмы крови крыс, нг/мл			
			Контрольн ая группа	Группа 1 – 50 мг/м ³	Группа 2 – 250 мг/м ³	Группа 3 – 1250 мг/м ³
1	58	Ацетон	18 ± 4	25 ± 5	81 ± 20	98 ± 24
3	59	Трет-бутанол	-	-	следы	следы
4	72	Бутанон	-	-	-	следы
6	56	Бутанол-1	47 ± 10	53 ± 13	68 ± 10	90 ± 22

Выявлено дозозависимое увеличение концентраций ацетона и бутанола-1 в плазме крови крыс экспонированных разными количествами углеводов.

*

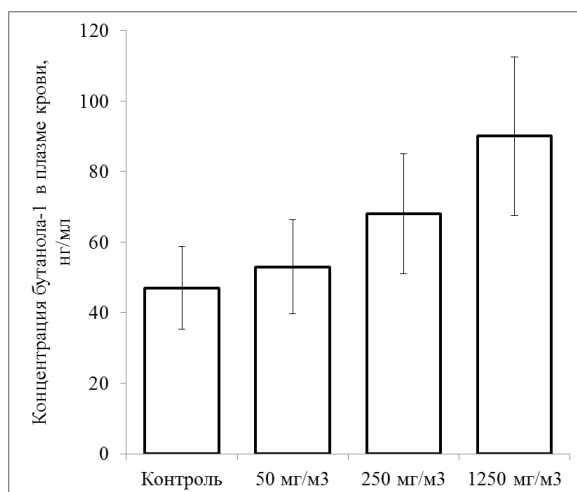
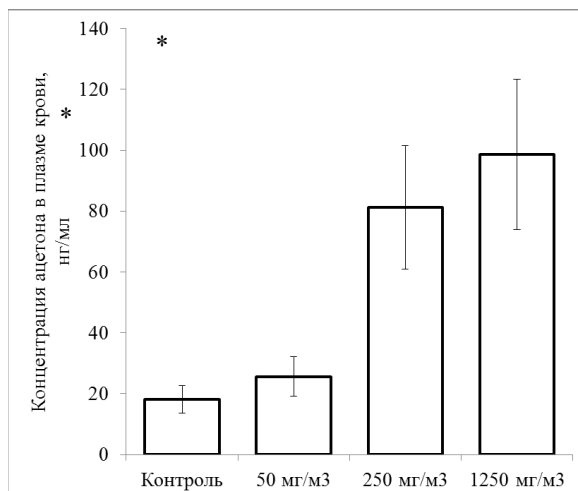


Рисунок 1 – Концентрации ацетона и бутанола-1 в плазме крови крыс экспонированных различными дозами углеводов. Знаком "*" обозначены достоверные изменения ($p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой

Помимо ацетона и бутанола, в крови крыс обнаружены следы *трет*-бутанола (2 и 3 группы) и бутанола-2 (3 группа). Таким образом, в плазме крови крыс обнаружены метаболиты трех основных углеводов, составляющих 66% от массы всей смеси. Обнаружить следы неметаболизированных форм углеводов не удалось.

Выводы

Непрерывное ингаляционное воздействие смеси предельных углеводородов C₁-C₅ с концентрацией $1250,0 \pm 51,5$ мг/м³ приводит к достоверному повышению концентрации ацетона и *n*-бутанола в крови подопытных крыс. Воздействие смеси с концентрацией $255,7 \pm 15,7$ мг/м³ приводит к достоверному повышению только ацетона. Смесь с концентрацией $50,2 \pm 6,1$ мг/м³ не вызывает достоверных изменений в составе летучих компонентов крови.

Литература

1. Lewis, R.J. Sr. (ed) Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials. 11th Edition. Wiley-Interscience, Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. 2004., p. 2331
2. Ford MD, Delaney KA, Ling LJ, Erickson T; Clinical Toxicology. W.B. Saunders Company., Philadelphia, PA. 2001, p. 789
3. Rom, W.N. (ed.). Environmental and Occupational Medicine. 2nd ed. Boston, MA: Little, Brown and Company, 1992., p. 536
4. Snyder, R. (ed.) Ethyl Browning's Toxicity and Metabolism of Industrial Solvents. 2nd ed. Volume 1: Hydrocarbons. Amsterdam - New York - Oxford: Elsevier, 1987., p. 259
5. Bingham, E.; Cohrssen, B.; Powell, C.H.; Patty's Toxicology Volumes 1-9 5th ed. John Wiley & Sons. New York, N.Y. (2001)., p. 487
6. Haq M.Z., Hameli A.Z. A death involving asphyxiation from propane inhalation // J Forensic Sci. 1980. V. 25. N. 1. P. 25-28.
7. European Chemicals Bureau; IUCLID Dataset, Propane (74-98-6) (2000 CD-ROM edition). Available from, as of October 13, 2006: <http://esis.jrc.ec.europa.eu/>
8. Tsukamoto S., Chiba S., Muto T., Ishikawa T., Shimamura M. Study on the metabolism of volatile hydrocarbons in mice--propane, n-butane, and iso-butane // J Toxicol Sci. 1985. V. 10. N. 4. P. 323-332.
9. Clayton, G. D. and F. E. Clayton (eds.). Patty's Industrial Hygiene and Toxicology: Volume 2A, 2B, 2C: Toxicology. 3rd ed. New York: John Wiley Sons, 1981-1982., p. 3183
10. Walker R., Flanagan R.J., Lennard M.S., Mills G.A., Walker V. Solid-phase microextraction: investigation of the metabolism of substances that may be abused by inhalation // J Chromatogr Sci. 2006. V. 44. N. 7. P. 387-393.
11. Dahl A.R., Damon E.G., Mauderly J.L., Rothenberg S.J., Seiler F.A., McClellan R.O. Uptake of 19 hydrocarbon vapors inhaled by F344 rats // Fundam Appl Toxicol. 1988. V. 10. N. 2. P. 262-269.