

**ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ КРЫС ПОДВЕРГАВШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ
АЛИФАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ С ЧИСЛОМ АТОМОВ УГЛЕРОДА ОТ 6
ДО 10**

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. Кузьмолровский,

ст. Капитолово, корп. № 93

**E-mail: AntonUkolov@gmail.com.*

Резюме: Проведено определение метаболитов гексана, гептана и октана в образцах плазмы крови, головного мозга и печени крыс подвергавшихся воздействию алифатических углеводородов C₆-C₁₀. Методами газовой хроматомасс-спектрометрии с твердофазной микроэкстракцией обнаружены гексанон-2 и гептанон-2 в печени и головном мозге, гексанол-1 обнаружен только в мозге. В образцах плазмы крови выявлены гексанон-2, гептанон-2, октанол-1 и 2,5-гександион. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием высокого разрешения в плазме крови идентифицирован диметилпирролнорлейцин. Метаболиты более тяжелых углеводородов не были выявлены.

Ключевые слова: углеводороды, гексан, гептан, октан, ВЭЖХ-МС, ГХ-МС, плазма крови, мозг, печень.

**GC-MS AND HPLC-MS ANALYSIS OF BIOLOGICAL SAMPLES FROM RATS
EXPOSED BY ALIPHATIC C6-C10 HYDROCARBONS**

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

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology Federal

State Unitary Enterprise, Federal Medical Biological Agency of Russia

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

Leningrad Region, Russian Federation

**AntonUkolov@gmail.com*

Abstract: A metabolites of hexane, heptane and octane was determined in plasma samples, brain and liver of rats exposed to aliphatic hydrocarbons. Hexanone-2, heptanone-2 was determined in the liver and brain, hexanol-1 was found only in the brain. In the plasma samples

was detected hexanone-2, heptanone-2, 1-octanol, 2,5-hexanedione. Dimethylpyrrolnorleucine was determined in blood by HPLC-MS. Metabolites of C9-C10 hydrocarbons have not been identified.

Key words: hydrocarbons, hexane, heptane, octane, HPLC-MS, GC-MS, blood plasma, brain, liver.

Введение

Объектом исследования являлась смесь предельных углеводородов C₆-C₁₀. В таблице 1 приведены соотношения компонентов смеси предельных углеводородов. Соотношения компонентов смеси определяются их реальными соотношениями концентраций в воздухе рабочих зон.

Таблица 1 - Соотношения компонентов смеси предельных углеводородов

Соотношения компонентов смеси C ₆ -C ₁₀				
C ₆ H ₁₄	C ₇ H ₁₆	C ₈ H ₁₈	C ₉ H ₂₀	C ₁₀ H ₂₂
4,4	17,8	4,4	0,3	0,3

Смесь предельных углеводородов подавали в камеры непрерывно в течении 90 суток с помощью специально сконструированного дозатора, позволяющего точно регулировать и постоянно поддерживать заданную концентрацию смеси в камере в течение эксперимента.

Подопытные животные были разделены на 4 группы: первая группа была экспонирована смесью с концентрацией $160 \pm 20,5$ мг/м³, вторая - $31,4 \pm 5,6$ мг/м³, третья – $5,2 \pm 1,08$ мг/м³ и четвертая – контрольная. (1 группа).

Метаболизм предельных углеводородов изучен достаточно хорошо, особенно н-гексана. На рисунке 1 представлена общая схема метаболизма н-гексана. На первой стадии происходит гидроксилирование с образованием гексанола-1 и гексанола-2, затем окисление образовавшихся спиртов до альдегидов и кетонов, соответственно. Более поздние исследования [1] указывают что возможно также окисление н-гексана до гексанола-3 (не представлен на схеме). Согласно многочисленным исследованиям (см. например, [2, 3, 4]), самым токсичным из метаболитов н-гексана является 2,5-гександион (25ГД), и именно его используют для мониторинга рабочих контактирующим с гексаном в своей профессиональной деятельности. Однако, стоит отметить тот факт, что мониторинг 25ГД проводится в моче, так как в крови уровень этого метаболита значительно ниже. Кроме того, в моче возможно определение глюкуронидов образующихся спиртов методом ВЭЖХ-МС [5].

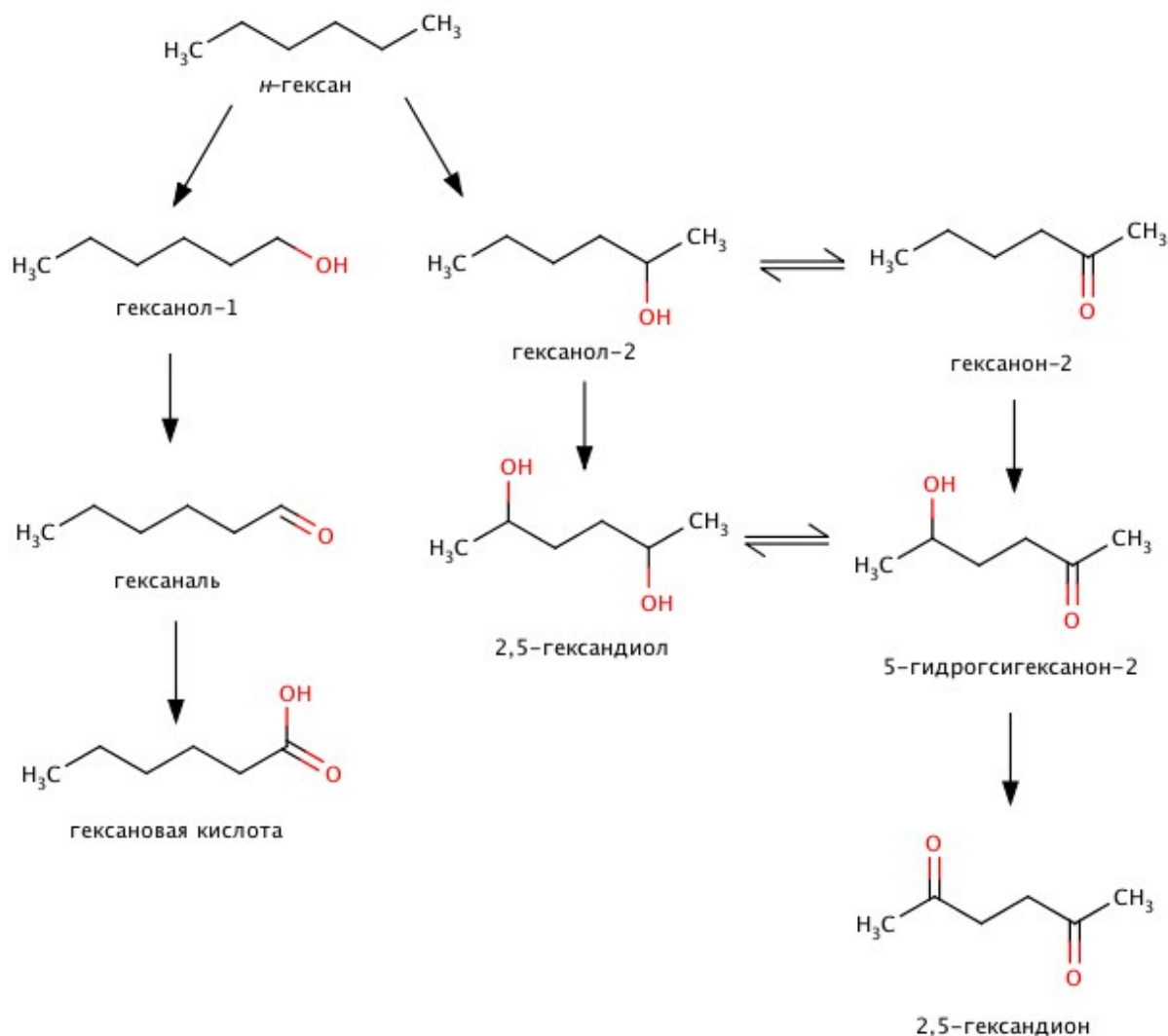


Рисунок 1 – Общая схема метаболизма н-гексана [6]

Остальные углеводороды из рассматриваемой смеси C₆-C₁₀ изучены значительно хуже, однако можно заключить, что их метаболизм протекает аналогичным способом. Метаболизм н-гептана рассмотрен в работе [7]. С точки зрения установления негативного влияния алифатических углеводородов наиболее полезным оказывается определение 2,5-алкандионов, 2-алканонов и 2-алканолов. В работе [8], показано, что при средней концентрации в воздухе рабочей зоны на обувной фабрике в 411 ± 336 мг/м³, максимальная концентрация 25ГД в моче достигала 30 мкг/мл. 2,5-диметилфуран и 2-гексанол достигали 0,5 и 0,05 части от количества 25ГД. Концентрации остальных метаболитов варьировали от 0,5 до 2,5 мкг/мл. Токсичность метаболитов н-гексана, как показано в работе [9] изменяется в следующем порядке: 2,5-гександион > 5-гидроксигексанон-2 > гексанон-2 > н-гексан.

2,5-алкандионы [10] обладают повышенной нейротоксичностью и вызывают токсическую нейропатию [11], центральную и периферическую дистальную аксонопатию [12]. Именно 2,5-алкандионы, или γ -дикетоны способны к образованию замещенных пирролов при реакции с аминогруппами в белках [13] (см.рисунок 2).

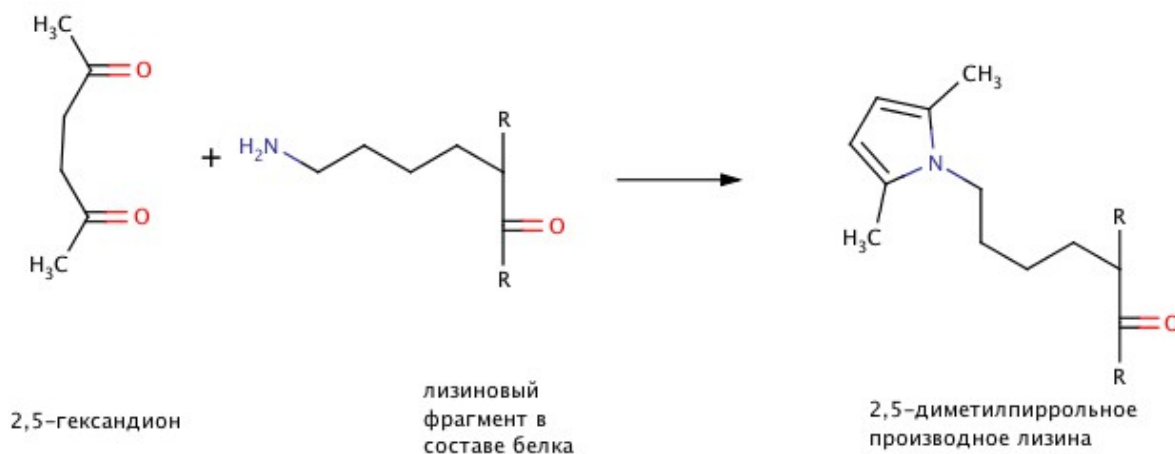


Рисунок 2 – Схема образования замещенных пирролов при реакции 2,5ГД с аминогруппами в белке

В работе [14] показан пример идентификации пиррольных соединений в моче крыс экспонированных 25ГД, показано образование пиррольных аддуктов, и последующее их окисление, что вызывает "сшивку" протеинов в нейрофиламентах. Стоит отметить, тот факт, что в этой же работе рассмотрен конкурирующий механизм, а именно сочетание пиррольных производных с сульфгидрильными группами, что приводит к уменьшению их токсичности.

Цель работы

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

Материалы и методы

В работе использовали газовый хроматомасс-спектрометр Shimadzu QP2010plus и капиллярной колонкой HP-5MS, 30 м × 250 мкм, толщина слоя фазы 0.25 мкм. Жидкостный хроматограф Accela (Thermo, США) с масс-спектрометрическим детектором LTQ Orbitrap Velos (Thermo, США) с орбитальной ионной ловушкой был оборудован колонкой Zorbax SB-C18 - 4.6 мм × 150 мм × 1.8 мкм.

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 $p < 0.05$.

ГХ-МС: Образцы плазмы крови от одной группы крыс объединяли так чтобы полученный объем пулированного образца составлял 3 мл. Затем последовательно добавляли два раза по 3 мл ацетонитрила, два раза по 3 мл диэтилового эфира, два раза по 3 мл этилацетата. При этом каждый раз пробирку помещали в вортекс на 5 минут для интенсивного встряхивания, а затем центрифугировали в течение 5 минут при 3900 об/мин (что примерно соответствует 4000G). Объединенный органический слой упаривали под током азота в FMS SuperVar до объема в 10 мкл. Затем отбирали аликвоту в 1 мкл и вводили в инжектор газового хроматографа. Остаток разбавили метанолом до 100 мкл и аликвоту в 5 мкл вводили в жидкостной хроматограф, затем остаток упаривали досуха под током азота при комнатной температуре и к сухому остатку прибавляли 20 мкл N-метил-N-триметилсилилтрифторацетамида. Далее пробу выдерживали в нагревателе 30 минут при 80°C. После охлаждения анализировали 1 мкл реакционной смеси.

Условия хроматомасс-спектрометрического анализа приведены в таблице 2:

Таблица 2 - Условия газохроматографического разделения и масс-селективного детектирования

Условия анализа	Характеристики
Газ-носитель	Гелий газообразный высокой чистоты марки 6.0, объемная доля гелия не менее 99.9999% об.
Режим ввода пробы	Объем пробы 1 мкл, без деления потока (1 мин), под давлением 69 кПа
Температурный режим термостата колонки	1 минута при температуре 70 °C, затем подъем до 200 °C со скоростью 10 °C/мин, затем подъем до 270 °C со скоростью 15 °C/мин, затем 10 минут при конечной температуре.
Температура инжектора	250 °C
Объемная скорость газа-носителя через колонку	1 мл/мин
Режим работы масс-спектрометра	Температура источника ионов: 280 °C. Температура квадруполей: 150 °C. Температура интерфейса: 280 °C.

Автоматическую интерпретацию результатов анализа выполняли с использованием ПО AMDIS с подключенными библиотеками NIST/EPA/NIH 2008, Pfleger-Maurer-Weber 2007.

ВЭЖХ-МС/МС анализ. Градиентное элюирование осуществлялось с использованием 5 мМ раствора HCOONH_4 (Фаза А) и 0,01% раствора HCOOH в воде (Фаза Б). Скорость подачи подвижной фазы 0.2 мл/мин. На начальном этапе состав элюента (100% А), затем, после 3 мин до 15 мин от 0 до 80% фазы Б. От 15 до 17 мин 80% фазы Б. От 17 до 17.01 мин 80-0% фазы Б. От 17 до 22 мин 0% фазы Б. Объем вводимой пробы – 5мкл

Условия работы масс-спектрометрического детектора: (электроспрей в режиме отрицательной ионизации): температура газа-осушителя 300°C, скорость потока газа-осушителя 8 дм³/мин, давление на распылителе 35 psig. Напряжение на капилляре 3кВ.

ГХ-МС-ТФМЭ: Определение целевых веществ выполняли методом газовой хроматографии масс-спектрометрии 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°C (1 мин), затем со скоростью 10 °/мин температуру увеличивали до 280°C и выдерживали колонку при 280°C в течение 35 минут. Температура инжектора составляет 250°C. Температура интерфейса - 280°C. Температура ионного источника масс-спектрометра - 200°C. Энергия ионизирующих электронов – 70 эВ.

Таблица 3 - Идентифицированные метаболиты УВ

УВ и их метаболиты	Методы обнаружения	Образец (концентрация)	Группа
Гексан C₆H₁₄			
Гексанон-2	ГХ-МС ВЭЖХ-МС/МС	Плазма (следы), Мозг (1252 нг/мг), Печень (325 нг/мг)	160 мг/м ³
Гексанол-1	ГХ-МС	Мозг (272 нг/мг)	160 мг/м ³
2,5-гександион	ВЭЖХ-МС/МС	Плазма*	160 мг/м ³
Диметилпиррол-норлейцин (ДПМН)	ВЭЖХ-МС/МС	Плазма*	160 мг/м ³
Гептан C₇H₁₆			
Гептанон-2	ГХ-МС ВЭЖХ-МС/МС	Плазма (следы), Мозг (17 нг/мг), Печень (40 нг/мг)	160 мг/м ³
Октан C₈H₁₈			
Октанол-1	ГХ-МС	Плазма (4 нг/мл)	160 мг/м ³

Примечание: * - количественное определение не проводилось

В результате проведенного исследования биологических образцов были выявлены метаболиты гексана, гептана и октана. Метаболиты более тяжелых углеводородов не были выявлены. Все обнаруженные соединения были выявлены в группе с максимальной концентрацией углеводородов во вдыхаемом воздухе (160 мг/м³).

Выводы

Непрерывное ингаляционное воздействие смеси предельных углеводородов C₆-C₁₀ с концентрацией 160 ± 20,5 мг/м³ приводит к накоплению гексанона-2 и гептанона-2 в головном мозге и печени подопытных крыс, гексанола-1 в мозге, октанола-1 в плазме крови, помимо этого в плазме крови обнаружен 2,5-гександион, наиболее токсичный метаболит *n*-гексана, а также диметилпирролнорлейцин – селективный и специфичный маркер хронического воздействия *n*-гексана.

Смеси с концентрациями $31,4 \pm 5,6$ мг/м³ и $5,2 \pm 1,08$ мг/м³ не приводят к накоплению метаболитов углеводов в концентрациях превышающих пределы обнаружения разработанными методами.

Литература

1. Toftgard R., Haaparanta T., Eng L., Halpert J. Rat lung and liver microsomal cytochrome P-450 isozymes involved in the hydroxylation of n-hexane // Biochemical pharmacology. 1986. V. 35, N. 21. P. 3733-3738.
2. Gobba F., Cavalleri A. Color vision impairment in workers exposed to neurotoxic chemicals // Neurotoxicology. 2003. V. 24. P. 693-702.
3. Huang C.C. Polyneuropathy induced by n-hexane intoxication in Taiwan // Acta Neurol Taiwan. 2008. V. 17. P. 3-10.
4. Murata K., Araki S., Yokoyama K., Yamashita K., Okajima F., Nakaaki K. Changes in autonomic function as determined by ECG R-R interval variability in sandal, shoe and leather workers exposed to n-hexane, xylene and toluene // Neurotoxicology. 1994. V. 15. P. 867-75.
5. Manini P., Andreoli R., Mutti A., Bergamaschi E., Franchini I. Determination of free and glucuronated hexane metabolites without prior hydrolysis by liquid- and gas-chromatography coupled with mass spectrometry // Toxicology Letters. 1999. V. 108. P. 225-231.
6. Perbellini L., Grandis D., Semenzato S., Rizzuto N., Simonati A. An Experimental Study on the Neurotoxicity of n-Hexane Metabolites: Hexanol-1 and Hexanol-2 // Toxicol appl pharm. 1978. V. 46. P. 421-427.
7. Bahima J., Cert A., Menendez-Gallego M. Identification of Volatile Metabolites of Inhaled n-Heptane in Rat Urine // Toxicol appl pharm. 1984. V. 76. P. 473-482.
8. Perbellini L., Brugnone F., Pavan I. Identification of the Metabolites of n-Hexane, Cyclohexane, and Their Isomers in Men's Urine // Toxicol appl pharm. 1980. V. 53. P. 220-229.
9. Abou-Donia M.B., Makkawy H.A., Graham D.G. The Relative Neurofoxicities of n-Hexane, Methyl n-Butyl Ketone, 2,5-Hexanediol, and 2,5-Hexanedione following Oral or Intraperitoneal Administration in Hens // Toxicol appl pharm. 1982. V. 62. P. 369-389.
10. DeCaprio A. Molecular mechanisms of diketone neurotoxicity // Chem.-Biol. Interactions. 1985. V. 54. P. 257-270.

11. Donoghue J.L., Krasavage W.J., Divincenzo G.D., Ziegler D.A. Commercial-Grade Methyl Heptyl Ketone (5-Methyl-2-octanone) Neurotoxicity: Contribution of 5-Nonanone // *Toxicol appl pharm.* 1982. V. 62. P. 307-316.
12. Abou-Donia M.B., Lapadula D.M., Suwita E. Cytoskeletal proteins as targets for organophosphorus compound and aliphatic hexacarbon-induced neurotoxicity // *Toxicology.* 1988. V. 49. P. 469-477.
13. Decaprio A., Olajos E.J., Weber P. Covalent Binding of a Neurotoxic n-Hexane Metabolite: Conversion of Primary Amines to Substituted Pyrrole Adducts by 2,5-Hexanedione // *Toxicol appl pharm.* 1982. V. 65. P. 440-450.
14. Torresa M.E., Gonsalves L.L., Bronze M.R., dos Santos M., Batoreu M.C., Mateus M.L. Alternative biomarkers of n-hexane exposure: Characterization of aminoderived pyrroles and thiol-pyrrole conjugates in urine of rats exposed to 2,5-hexanedione // *Tox Lett.* 2014. V. 224, N. 1. P. 54–63.