Авторский коллектив

Апполонова Светлана Александровна — канд. хим. наук, доцент кафедры фармакологии Института фармации им. А.П. Нелюбина, заведующая лабораторией фармакокинетики и метаболомного анализа Института трансляционной медицины и биотехнологии Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)

Афанасьева Елена Юльевна — канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории лекарственной токсикологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е.И. Чазова» Минздрава России, старший преподаватель кафедры медицинской элементологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы»

Еремин Сергей Александрович — д-р хим. наук, проф., ведущий научный сотрудник, руководитель группы иммуноанализа кафедры химической энзимологии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», заслуженный научный сотрудник Московского университета, член научного совета РАН по аналитической химии

Калетина Наталья Ивановна — д-р биол. наук, проф., акад. АМТН, член Научного совета РАН по аналитической химии, в прошлом — зав. кафедрой токсикологической химии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), один из организаторов и профессор кафедры экспертизы в допинг- и наркоконтроле ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева»

Киричек Александр Васильевич — начальник отдела судебно-химической экспертизы ФГКУ «111 Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» Минобороны России, старший преподаватель кафедры экспертизы в допинг- и наркоконтроле ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева»

Красилова Екатерина Вадимовна — судебный эксперт-химик ГБУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы ДЗМ»

Скальный Анатолий Викторович — д-р мед. наук, проф., директор Центра биоэлементологии и экологии человека ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), заведующий кафедрой медицинской элементологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы», вице-президент Института микроэлементов ЮНЕСКО (Trace Element-Institute for UNESCO, Lyon, France), лауреат премии правительства РФ за цикл научных трудов (2023)

Симонов Евгений Анатольевич — судебно-медицинский эксперт отдела судебно-химической экспертизы ФГКУ «111 Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» Минобороны России, старший преподаватель кафедры экспертизы в допинг- и наркоконтроле ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева» (ушел из жизни)

Хабриев Рамил Усманович — д-р мед. наук, д-р фарм. наук, проф., акад. РАН, научный руководитель ФГБНУ «Национальный НИИ общественного здоровья им. Н.А. Семашко»

Шабалина Ангелина Эдуардовна — канд. хим. наук, заведующая отделением инструментальных методов анализа отдела судебно-химической экспертизы ФГКУ «111 Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» Минобороны России

Предисловие

Нашим учителям — профессору Марии Дмитриевне Швайковой
и профессору Борису Николаевичу Степаненко
посвящается

Участившиеся случаи отравления наркотическими средствами и психотропными веществами, бесконтрольное употребление лекарственных препаратов, использование фальсифицированных лекарственных средств и суррогатов алкоголя, экологически и профессионально обусловленные заболевания наносят большой ущерб здоровью людей. Общество способно успешно противостоять подобным химическим угрозам и ситуациям при возможности быстрой и надежной диагностики не только известных токсикантов, но и вновь синтезированных (или введенных в оборот) веществ и их смесей.

В последние годы значительно расширились возможности организаций различных ведомств выполнять на современном уровне развития аналитической техники и методологии большие объемы химико-токсикологических исследований различных по своей природе веществ в рамках судебно-химических, клинико-токсикологических, допинговых, криминалистических, экологических и других экспертиз.

Учебник «Токсикологическая химия» отражает современный многопрофильный подход к определению наркотических средств, психотропных веществ, допингов, макро- и микроэлементов, алкоголя, технических жидкостей, природных токсинов, пестицидов и других экотоксикантов в объектах биологической и небиологической природы. В первой части книги (главы 1–5) обсуждаются классификация токсичных агентов, механизмы токсического действия и межклеточной коммуникации, генный полиморфизм и индивидуальная химическая чувствительность; этапы метаболизма токсикантов (хемобиокинетики); с учетом инновационных технологий представлены аспекты метаболомики и метабономики; различные способы пробоподготовки биологических образцов и объектов различной природы; химические, иммунохимические, физико-химические, в частности ГХ-МС, ВЭЖХ-МС-ЯМР, ВЭЖХ-ИСП-МС, ГХ-ИК- Фурье, ГРС, ГХ-ИСП-МС, СВЭЖХ-МС/МС, ГХ-МС/МС, КЭ-ИСП-МС и другие методы анализа. Внимание читателя обращено на необходимость обеспечения правильности получаемых результатов в рамках производства экспертиз и исследований согласно принципам надлежащей лабораторной практики.

Во второй части книги (главы 6–10) обсуждаются вопросы метаболизма *важнейших представителей* различных групп токсикантов, допинговых средств, природных токсинов, а также пестицидов и других экотоксикантов, способы их идентификации и количественного определения.

Учебник состоит из 10 глав, предисловия, введения и заключения, списков сокращений и рекомендованной литературы.

Большинство глав значительно дополнены научной информацией о достижениях в области аналитической токсикологии за прошедшие после выхода первого издания учебника 12 лет (2010–2022 гг.), что нашло отражение в обновленном списке рекомендованной литературы.

Книга написана с позиции междисциплинарного подхода к решению задач химико-токсикологического анализа (ХТА) разной направленности (судебного, клинического, экологического, криминалистического), допинг- и наркоконтроля. Учебник содержит значительный эксклюзивный иллюстративный материал, полученный в реальных условиях экспертиз с использованием самых современных физико-химических методов анализа. Высокий научно-методический уровень изложения, обширные экспериментальные и справочные материалы, приведенные в книге, стимулируют компетентностно-ориентированную направленность обучения.

Освоение предлагаемого курса токсикологической химии (аналитической токсикологии) повысит компетентность студентов, что позволит будущим специалистам принимать обоснованные решения согласно поставленным задачам современного системного анализа токсикантов различных групп.

Книга предназначена для студентов вузов, обучающихся по специальности 33.05.01. «фармация» в соответствии с требованиями совершенствования учебного процесса высшего образования, изложенными в Федеральных государственных образовательных стандартах третьего поколения, а также для студентов химико-технологических, биологических и экологических специальностей.

Авторы выражают искреннюю благодарность проф. Е.Я. Борисовой, проф. В.Б. Герасимову, проф. Н.А. Павловской, канд. тех. наук А.Е. Коваленко, к. ф. н. А.В. Смирнову, к. ф. н. А.В. Чукарину за предоставленные материалы, а также Л.В. Гнучая и Марии Афанасьевой за техническую помощь при подготовке рукописи к изданию.

К глубокому сожалению, за годы, прошедшие после выхода первого издания книги, ушли из жизни три наши соавтора: С.К. Еремин, канд. мед. наук Г.И. Калетин, Е.А. Симонов. Мы высоко ценим их значительный вклад в создание учебника. Это о них можно сказать: «Так мало прожито, так много сделано…». Е.А. Симонов был награжден рядом высоких государственных наград, в том числе весьма редкой – «Профессионал России». Они не только писали книги, но и – каждый на своем месте – помогали конкретным людям своими знаниями и умениями… В этом издании учебника принимают участие соратники и ученики ушедших от нас коллег.

Авторы будут признательны за критические замечания и кон- структивные предложения, направленные на улучшение книги.

Авторы

Введение

Бессознательное заучивание различных
приемов… не может принести никакой
пользы… необходимо дать понять ученику,
почему поступают так, а не иначе.

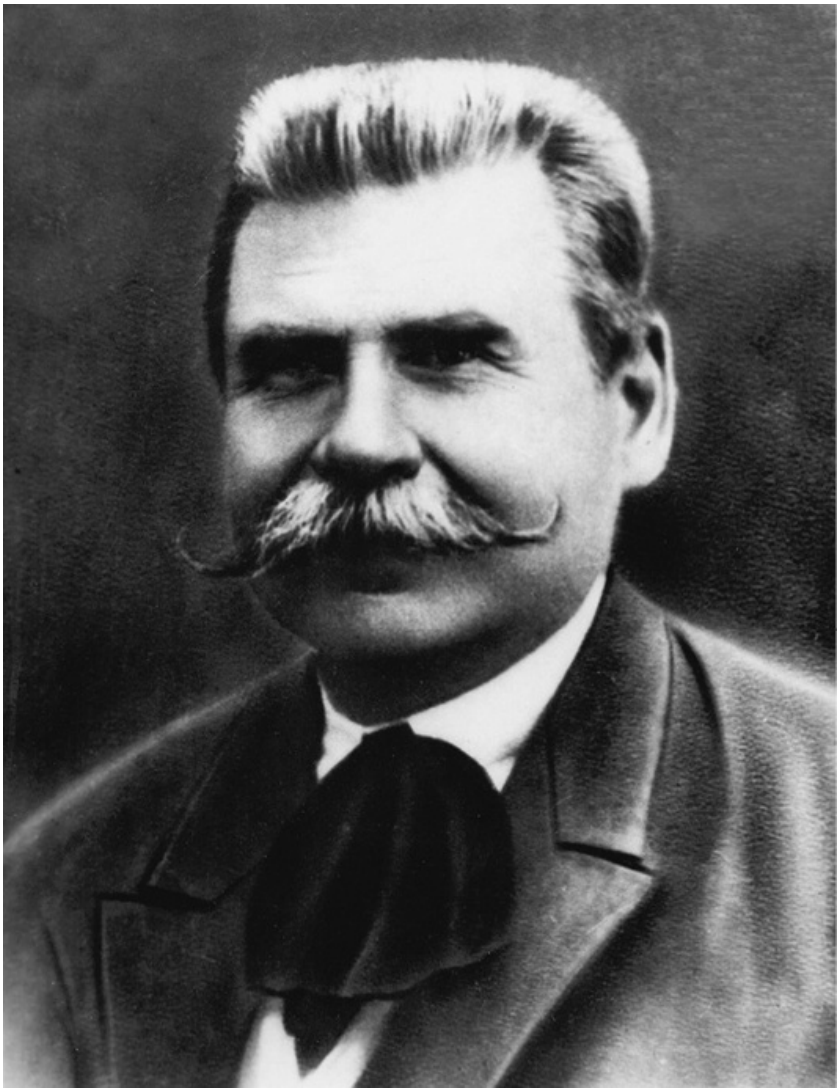
Пафнутий Львович Чебышев (1821–1894),
русский математик и механик,
академик Петербургской АН
и еще 24 академий наук других стран

Такими были наши учителя… Исторически сложилось, что в России судебную токсикологию называют судебной химией. Становлению судебной химии предшествовал длительный период проведения отдельных судебно-химических экспертиз и химических исследований (XVI–XVII вв.). Учебная дисциплина «Открытие ядов», или (в современном понимании) судебная химия, входила в курс фармации, преподававшейся на медицинских факультетах Московского, Дерптского, Харьковского университетов и Императорской медико-хирургической академии. «Важность судебной химии с присовокуплением общей токсикологии и влияние ее на судебную медицину очевидна». Это слова профессора Александра Петровича Нелюбина (1785–1858), чьи труды внесли большой вклад в становление и развитие судебной химии в России. Широкой известностью пользовалась его работа «Общая и частная судебно-медицинская и медико-полицейская химия с присоединением общей и частной токсикологии или науки о ядах и противоядных средствах» (1851–1852).

Медицинский факультет Московского университета многое сделал для развития судебной химии, создания московской школы фармации.

В лаборатории кафедры органической химии профессора А. В. Степанова, который стал впоследствии ведущим ученым в области отечественной судебной химии, выросли его любимые ученики, а потом и соратники: заслуженный деятель науки РСФСР, профессор М. Д. Швайкова и заслуженный деятель науки РСФСР, профессор Б. Н. Степаненко, которые по представлению А.В. Степанова заняли кафедры судебной и органической химии (соответственно) фармацевтического института, затем факультета 1-го ММИ (сегодня Первый МГМУ им. И. М. Сеченова) и успешно руководили этими кафедрами в течение 40 лет. «Повторять слова учителя — не значит

быть его продолжателем. Надо помнить ту цель, к которой шел учитель», — этими словами Д. И. Писарева всегда напутствовал своих учеников профессор Б. Н. Степаненко.



Александр Васильевич Степанов

А. М. Бутлеров, В. В. Марковников, А. Д. Булыгинский, В. С. Гулевич, А. В. Степанов, М. Д. Швайкова, Б. Н. Степаненко… Это прямая линия учитель–ученик. Не рвется связь времен... Сохранены традиции российского и советского университетского образования. «Традиции — это не сохранение пепла, а передача огня» (Густав Малер, австрийский композитор).



Мария Дмитриевна Швайкова



Борис Николаевич Степаненко

В начале XX в. были организованы судебно-медицинские лаборатории с судебно-химическими отделениями при них, позже был создан Государственный научно-исследовательский институт судебной медицины МЗ СССР (сегодня — ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» МЗРФ).

Исследования М. Д. Швайковой и ее учеников внесли большой вклад в развитие судебной химии. Обобщение накопленных материалов послужило основой для создания М. Д. Швайковой учебника по судебной химии, выдержавшего три издания (1959, 1965 и 1975 гг.). Учебник 1975 года издания имел уже другое название —

«Токсикологическая химия». Почему? Прежде всего это было обусловлено сложившейся к тому времени ситуацией — глобальным распространением разнообразных химических веществ и их применением практически во всех отраслях хозяйства. В результате этого в биосфере стало циркулировать большое количество чужеродных для человека и животных соединений, существенно изменились состав и качество пищи и др. Все эти изменения необходимо контролировать по многим параметрам, что требует постоянного совершенствования аналитических методов.

ХТА — это системный анализ, целью которого является обнаружение и количественное определение токсичных (экзогенных) веществ и/ или их метаболитов в биосубстратах живых лиц, секционном материале и вещественных доказательствах отравления.

Токсикант (яд) — прежде всего *категория количественная*. «Яд — это химическое вещество, которое в соприкосновении с живыми организмами в определенных условиях среды обитания и *в определенном количестве* способно оказывать повреждающее влияние на живые организмы, вплоть до гибели» (С. А. Куценко). Строго научного определения «токсичное химическое вещество» на сегодняшний день не существует.

Судебно-химическая и криминалистическая экспертиза, экспертиза на алкогольное или наркотическое опьянение у живых лиц, допинг-контроль, диагностика острых отравлений, профессиональных или экологически обусловленных заболеваний, исследования в области клинической фармакологии, гигиеническое нормирование вредных веществ в объектах окружающей среды, эколого-эпидемиологические исследования используют результаты *ХТА.*

Токсикологическая химия изучает химические превращения, связанные с первичным и вторичным метаболизмом чужеродных соединений**,** и методы определения токсичных веществ и их метаболитов в биологических объектах и объектах небиологической природы.

Токсикологическая химия находится в тесной связи с химическими и медико-биологическими дисциплинами (схема 1).

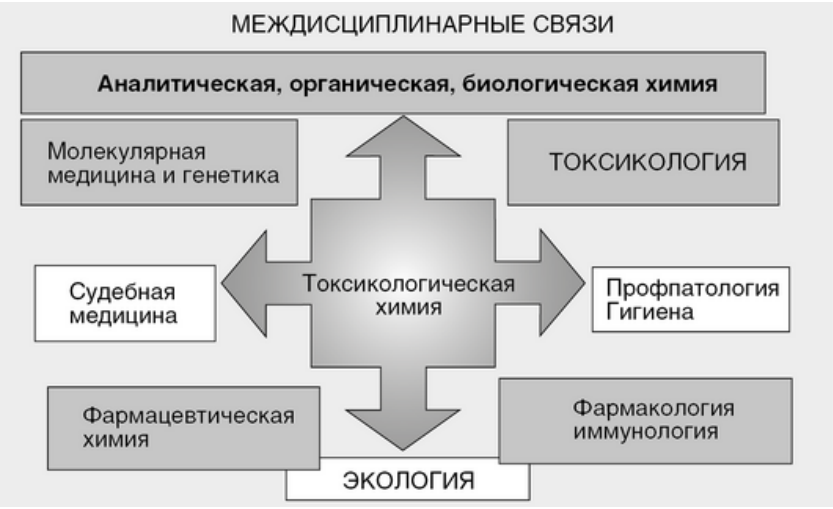


Схема 1

Во многих странах (и все чаще в России) токсикологическую химию называют аналитической токсикологией, что более полно отражает цели, задачи, области применения ХТА.

Успехи токсикологической химии зависят от состояния аналитической базы исследований. Число новых технологий и новых методов анализа стремительно растет. Применение таких аналитических систем, как газовая хроматография — масс-спектрометрия (ГХ-МС), высокоэффективная жидкостная хроматография (ЖХ) — масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС) или в комплексе с ядерно-магнитным резонансом (ВЭЖХ-МС-ЯМР), газожидкостная хроматография (ГЖХ) — Фурье-спектрометрия в инфракрасной области, Раман — Фурье-микроскопия, индуктивно-связанная плазма — масс-спектрометрия (ИСП-МС) и других, позволяет получать информацию о содержании

ультрамикроколичеств токсикантов в многокомпонентном биологическом образце (матрице), причем нередко в режиме реального времени.

Для исследования влияния токсикантов, имеющих мутагенные свойства, используют методы молекулярной биологии и генетики.

Приоритетные направления развития науки, технологий и техники в Российской Федерации предусматривают внедрение индустрии нанотехнологий для обеспечения безопасности живых систем.

Токсикологическая химия (аналитическая токсикология) — междисциплинарная область знаний, где достижения возможны только при совместных усилиях отдельных наук. «Междисциплинарное знание основано на идеях интеграции отдельных областей и на их синергизме. Последнее означает, что использование множества идей и подходов, присущих различным наукам, не приводит к их неупорядоченной смеси, а напротив — рождает качественно новое знание» (акад. Ю.Д. Третьяков, МГУ им. М.В. Ломоносова).

Часть I

Глава 1. Классификация токсичных агентов и виды токсического действия

Науки юношей питают,
Отраду старым подают.
В счастливой жизни украшают,
В несчастной случай берегут.

Михаил Васильевич Ломоносов (1711–1765),
первый крупный русский ученый-естествоиспытатель,
энциклопедист, физик, химик, астроном, поэт,
основатель Московского университета

Ядов в научном смысле нет.

Огюст Амбруаз Тардье (1818—1879),
выдающийся судебный медик
и защитник прав детей

1.1. Некоторые понятия, определения и термины, используемые в токсикологии

«Всякому известно, что в способе производить анализ, предшествующий наблюдению, один ум чрезвычайно разнится от другого. Анализ этот составляет сущность акта наблюдения. Наблюдателем следует назвать не того, кто только видит находящуюся пред его глазами вещь, а того, кто видит, из каких она частей состоит. *Исполнить это хорошо — есть редкое дарование*. Один человек от невнимания или оттого, что надлежащим образом направляет свое внимание, не замечает половины того, что видит; другой отмечает более того, что видит, смешивая видимое с воображаемым или с выводимым; другой отмечает род всех обстоятельств, но, будучи неопытен в оценке их степени, оставляет количество каждого обстоятельства неопределенным и неизвестным; иной хотя и видит целое, но неловко делит его на части, соединяет в одну массу вещи, которые должны быть отделены, и разъединяет другие, которые удобнее было бы рассматривать как одну вещь, так что результат тот же, а иногда и хуже того, как если бы он и не пытался анализировать»Милль, Джон Стюарт (1806—1873) — английский философ и психолог..

Редким аналитическим дарованием обладал А. Тардье, знаменитый судебный медик, с помощью химических методов неоднократно сумевший определить и доказать в суде случаи отравления ядами, идентификация которых и сегодня бывает затруднительна. Однако именно Тардье на основании своей огромной практики сделал заключение: «Ядов в научном смысле нет».

В практической деятельности судебные медики, судебные химики, токсикологи нередко используют термины «яд» или «ядовитое вещество». Но какое определение можно дать понятию «яд»? В начале XIX в. основоположник научной токсикологии Матье Джозеф Бонавентура Орфила (1787—1853), химик, физик и врач, профессор и декан медицинского факультета Сорбонны, писал: «Яд — вещество, которое в малом количестве, будучи приведенным в соприкосновение с живым организмом, разрушает здоровье или уничтожает жизнь».

Ранее, в XV в., последователь Аристотеля, Гиппократа и Галена, выдающийся ученый Филиппус Аурелиус Теофрастос Бомбастус фон Гогенхейм (Парацельс) сформулировал основы ятрохимии:

* «яд» по своей сущности является химическим агентом; * химические агенты необходимо и возможно экспериментально распознавать; * обнаружение–необнаружение ядов обусловлено дозой химического агента («все есть яд… и только доза отличает яд от лекарства»); * существует связь между природой химического соединения и его терапевтическим и токсическим действием.

Но задолго до Парацельса великий иранский поэт Рудаки (941 г.) написал: «Что ныне снадобьем слывет, то завтра станет ядом. И что ж? Лекарством этот яд опять сочтут больные». По мнению известного российского токсиколога Н. В. Лазарева, «яды — суть вещества, которые вызывают повреждение немеханическим путем» (1936 г.). Согласно определению судебного химика М. Д. Швайковой, «ядовитым веществом или ядом называют (условно) такое вещество, которое, будучи введено в организм в малых количествах и действуя на него при определенных условиях химически или физико-химически, способно вызвать болезнь или смерть» (1965 г.). Каждое из приведенных определений, как и множество других, можно подвергнуть критике. Авторы солидарны с мнением токсикологов, которые считают, что термин «яд» следует исключить из определений современной токсикологии и, в частности, с постулатом С. А. Куценко, что «ядом становится любое химическое вещество, если при соприкосновении с организмом оно вызвало заболевание (интоксикацию) или гибель».

В исследовательской и практической деятельности как в РФ, так и за рубежом гораздо чаще используются термины «токсикант» и «ксенобиотик» (часто как синонимы). Однако некоторое различие между этими понятиями существует.

Токсикант — это токсичное химическое вещество любой химической природы, способное нарушить гомеостаз биологической системы и оказать на нее вредное влияние при взаимодействии, вызывая повреждение или гибель.

Ксенобиотик — это чужеродное вещество, введенное любым путем в организм.

В российских научно-методических и учебных изданиях по токсикологии (Н. А. Лошадкин, С. А. Куценко, Б. А. Курляндский, В. А. Филов и др.) науку токсикологию определяют как «учение о токсичности и токсическом процессе — феноменах, регистрируемых при взаимодействии химических веществ с биологическими объектами».

Токсичность — свойство или способность химических веществ, действуя на биологические системы немеханическим путем, вызвать их повреждение или гибель.

Токсическое действие веществ, регистрируемое на популяционном и биогеоценологическом уровнях, называют *экотоксическим* (см. гл. 9).

Токсический процесс проявляется метаболическими, патоморфологическими, клиническими альтерациями (повреждениями), связанными с патогенетическим механизмом действия токсичного вещества. Развитие токсического процесса обусловлено действием многих факторов. Проявления токсического процесса изучают на молекулярно-генетическом, клеточном, органном, организменном и популяционном уровнях. На организменном уровне токсические процессы классифицируют как процессы, формирующиеся по *пороговому* (интоксикация) или *беспороговому* (тератогенез) *принципу.* Последний имеет вероятностный характер.

Интоксикация (отравление) — это нарушение функций организма под влиянием токсиканта, которое может привести к расстройству здоровья или смерти. Интоксикации могут быть острыми, подострыми и хроническими.

Острая интоксикация развивается в результате однократного или повторного действия веществ в течение ограниченного времени, *подострая* — в результате непрерывного или прерываемого во времени действия

токсиканта продолжительностью до 3 мес, х*роническая* — в результате продолжительного действия токсиканта (иногда в течение многих лет).

По степени тяжести интоксикацию подразделяют на *тяжелую* (угрожающую жизни), *средней тяжести* (необратимое повреждение органов и систем, приводящее к инвалидности, длительному течению заболевания, тяжелым осложнениям) и *легкую* (заканчивается полным выздоровлением пострадавшего).

Действие токсиканта может быть *местным* (процесс развивается непосредственно на месте аппликации токсиканта), *общим* (в процесс вовлекаются многие органы и системы) и *избирательным* (специфическое поражение органа или системы, имеющих низкий порог чувствительности к токсиканту).

В токсикологии, гигиене, экологии, медицине труда приняты нормативы допустимого воздействия химических веществ, находящихся в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе, воде и так далее, нормативы допустимых выбросов и сбросов химических, в том числе радиоактивных, веществ. Это юридически утвержденные дозы веществ, признаваемые для человека безопасными в повседневной жизни, на производстве, в аварийных ситуациях**.** Они рассчитываются на основе принятия концепции *пороговости.* Дозу, ниже которой современными методами исследования нельзя обнаружить действие токсиканта на биообъект, принято считать *пороговой дозой.*

Зависимость *доза–эффект*, т. е. зависимость наблюдаемого изменения в системе от содержания токсичного вещества в ней или в объектах окружающей среды, распространяется на все уровни организации биосистем.

Зависимость *доза–ответ* — это частота встречаемости наблюдаемых отклонений (ответов), достоверно отличающихся от нормальных уровней в изучаемой биосистеме, в зависимости от дозы токсиканта, поступившего в систему, или содержания токсиканта в объектах окружающей среды.

Основным параметром зависимости доза–эффект для конкретного токсиканта и определенного биообъекта является величина *среднеэффективной дозы (ED~50~*) вещества*,* при действии которой на объект развивается эффект, составляющий 50% максимально возможного.

В клинико-токсикологических и судебно-химических исследованиях интерпретация аналитических результатов как юридического ответа невозможна без сравнительной оценки полученных данных с общепринятыми и представленными в справочной литературе терапевтическими, токсическими или летальными концентрациями веществ в биожидкостях и тканях человека.

Терапевтическая концентрация — это концентрация лекарственного вещества в крови (сыворотке или плазме) человека, при которой препарат оказывает эффективное клиническое действие без значительных побочных эффектов. *Токсическая концентрация* — это концентрация лекарственного или другого химического вещества в крови (сыворотке или плазме) человека, при которой появляются значительные токсические симптомы. *Летальная концентрация* — это концентрация лекарственного или другого химического вещества в крови (сыворотке или плазме) человека, которая вызывает смерть или настолько превышает терапевтическую или токсическую концентрацию, что может вызвать смерть. Летальные концентрации веществ в крови трудно установить. Смерть может быть объяснена комплексом различных факторов: отравлением на фоне склеротического поражения органов, интоксикацией на фоне синдрома абстиненции и др.

1.2. Что понимать под зависимостью структура–токсичность

Нужно иметь смелость
высказывать свои убеждения.

Иван Михайлович Сеченов (1829–1905),
великий русский физиолог, создатель
российской физиологической школы

Знание физико-химических свойств токсикантов позволяет оценить многообразие их химических превращений, происходящих в организме, в том числе при взаимодействии со структурой-мишенью (см. гл. 2), выбрать способ

обнаружения и количественного определения токсиканта в биосредах (см. гл. 4) и при необходимости — методы детоксикации.

Химические вещества характеризуются разной токсичностью, которая может различаться в тысячи и десятки тысяч раз**.** Токсичность вещества определяется его природой. Взаимосвязь структуры вещества с его физическими и химическими свойствами изучают биоорганическая и бионеорганическая химия.

Можно выделить многие свойства токсиканта, влияющие на его токсичность, однако ни одно из них не будет определяющим, так как *биоактивность вещества проявляется при его взаимодействии с рецептором*. Что же следует понимать, говоря о связи *структура–токсичность (активность)*?

Действие токсиканта представляет собой сложный многоступенчатый процесс. Ассоциация токсиканта с рецептором — лишь начальный этап реализации биологической активности, за которым следуют дальнейшие события, которые в конечном счете могут проявиться в виде интоксикации (см. гл. 2). В связи с этим *о влиянии строения вещества на его действие* уместно говорить, только если рассматривается действие на рецептор.

Трудами многих выдающихся ученых XX в., в том числе и наших соотечественников, предложена обобщенная концепция регуляторных механизмов функций клетки. «Рецепторы — это генетически детерминированные мобильные, лабильные, главным образом белковые структуры, функции которых заключаются в “узнавании” химического сигнала и последующей его трансформации в адекватный ответ клетки» (П. В. Сергеев, 1999). Первоначально происходит «узнавание» рецептором соответствующего лиганда, которое характеризуется специфическим взаимодействием молекул-партнеров с высоким сродством друг к другу. В результате этого взаимодействия реализуется вторая функция рецепторов — трансформация полученного сигнала в биохимическую и затем в физиологическую реакцию живых систем. Рецепция, обеспечивающая восприятие и передачу информации клетке для формирования адекватной ответной реакции при воздействии кого-либо химического сигнала, является важнейшим гомеостатическим механизмом на клеточном и субклеточном уровнях. Большинство рецепторов представляют собой белки, их агрегаты и комплексы с нуклеиновыми кислотами или определенные низкомолекулярные вещества (см. гл. 2). Химический агент реализует свой эффект через взаимодействие с рецептором, который располагается либо на поверхности клетки, либо в одном или нескольких участках внутри нее. В ответ на возбуждение рецептора изменяется функция многих клеточных органелл и метаболических систем.

Существуют различные классификации рецепторов. Возрастающий уровень знаний в области биохимии и топографии рецепторов отражается и в их ранжировании. Информация об агонистах и антагонистах рецепторов, их клеточной локализации и сопряженности с биоструктурами приведена в гл. 2, 6–10.

По принципу выполняемых функций рецепторы делят на две группы:

* основные рецепторы, опосредующие действие лигандов на эффекторы; * рецепторы-модуляторы, опосредующие действие лигандов на функцию других рецепторов.

Деление на основные рецепторы и рецепторы-модуляторы достаточно условно, кроме того, основные рецепторы могут функционировать и взаимосвязанно. Рассмотрение только одного типа рецепторов недостаточно для понимания всех возможностей регуляции интегрального ответа клетки.

Рецепторы *не метаболизируют токсикант, а сами претерпевают обратимые химические изменения,* вызывающие последующие ступенчатые химические процессы, которые, в свою очередь, и приводят к определенному (например, токсическому) конечному эффекту.

Длительность и селективность взаимодействия токсиканта и рецептора определяются особенностями их химической природы, а также *видом связей* между ними. Между рецептором и токсикантом могут возникать ковалентные, водородные, ионные связи, диполь-дипольное или дисперсионное взаимодействие. Образование или разрыв любой из этих связей — химическая реакция, протекающая с заметным изменением энергии.

Прочную ковалентную связь с рецепторами токсиканты образуют редко. Чаще происходит образование *клатратов*, представляющих собой физическое включение молекул токсикантов в «карманы» (изгибы) молекул биополимера. Проявлению клатратного эффекта в значительной мере способствует образование нековалентных связей. Если

(в большинстве случаев) проявление биологического эффекта не связано с образованием ковалентной связи, то метаболизм токсиканта всецело определяется разрывом ковалентных связей в его молекуле. Разновидностью ковалентной связи является *координационная связь*, образование которой часто происходит во многих биохимических реакциях. Это связано с процессами синтеза, преобразования и разложения белков, реальную возможность протекания которых, их направление и скорость нередко обусловливают ионы металлов (см. гл. 7). Например, летальное действие цианид-ионов вызвано образованием координационной связи с центральным атомом железа, хелатированным в порфирине (гемы).

Водородные связи образуются лишь при очень малом расстоянии между взаимодействующими атомами и строго ориентированы в пространстве, поэтому они обладают высокой избирательностью и направленностью, что крайне важно при связывании токсиканта с рецептором. Эти связи во многом ответственны за формирование пространственной структуры биополимеров (белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот) и протекание важнейших биохимических процессов.

Электростатические взаимодействия (с большим радиусом действия) также играют существенную роль при взаимодействии токсикантов с рецепторами. Этот тип связей обеспечивает легкость обмена ионов. Прочность *ионной связи* уменьшается обратно пропорционально квадрату расстояния между разноименными зарядами, не имея строгой направленности в пространстве. В биологических средах, содержащих много конкурирующих гидратированных ионов, продолжительность существования таких связей может составлять 10^–5^ с именно вследствие ионного обмена.

Электростатическое взаимодействие между токсикантом и рецептором тем не менее может существовать в течение длительного времени, особенно если расстояние между ними способствует образованию еще и короткодействующих *ван-дер-ваальсовых сил*, таких как диполь-дипольное и дисперсионное взаимодействия. Энергия *диполь-дипольного взаимодействия* обратно пропорциональна III степени расстояния между частицами. За счет электростатического притяжения могут возникать также связи между диполями и ионами. *Дисперсионное взаимодействие* возникает между неполярными молекулами в тех случаях, когда структура двух молекул дает им возможность подойти друг к другу на достаточно близкое расстояние. Вре́менные (наведенные) диполи, образующиеся в молекулах за счет колебательной энергии, индуцируют диполи в других, соседних молекулах, что в конечном счете и приводит к возникновению притяжения между ними. Дисперсионные взаимодействия проявляются сильнее между молекулами с длинными цепями. Таким образом, в результате тесного контакта агента с рецептором между ними могут возникнуть достаточно прочные дисперсионные взаимодействия. Энергия дисперсионного взаимодействия изменяется обратно пропорционально VI степени расстояния между молекулами. Наличие в молекуле токсиканта ионизированной группы способствует сближению молекул до расстояния, на котором начинают действовать ван-дер-ваальсовы силы. Этот тип связи, по-видимому, имеет первостепенное значение в соединении токсиканта с рецептором.

Две молекулы могут быть связаны друг с другом ионными силами в одной точке и ван-дер-ваальсовыми — в другой, как, например, при интеркалировании токсикантом дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) (см. гл. 2), что значительно повышает прочность связи. Например, ряд лекарственных препаратов (рубомицин, адриамицин, акрихин, хингамин и др.), имея плоскую часть молекулы, интеркалируют в ДНК, вклиниваясь между па́рами оснований. Такой комплекс стабилизируется ван-дер-ваальсовыми силами, ионными связями с фосфатными группами ДНК (например, с карбкатионами токсиканта), координационными связями и другими, что препятствует расплетанию цепей ДНК и ее нормальному функционированию.

Теория рецепторных взаимодействий хорошо объясняет тот факт, что одна и та же химическая группа в зависимости от своего химического окружения может обусловливать действие как агониста, так и антагониста [например, ацетилхолина (АХ) и тубокурарина]. Агонисты возбуждают рецепторы, антагонисты блокируют их. При действии на один и тот же рецептор меньшая молекула точно соответствует участку связывания и активирует его, тогда как бо́льшая молекула, перекрывая рецептор, оказывает блокирующее действие.

Для проявления биологического действия наиболее важные свойства — распределение электронной плотности и пространственное строение молекулы токсиканта. От распределения электронной плотности зависит способность молекулы к ионизации, облегчающей или препятствующей взаимодействию вещества с рецептором. Стерические

свойства молекулы определяют степень ее комплементарности к рецептору. Например, ионы Cu^2+^, Fe^2+^, Zn^2+^ и ряда других металлов эффективно конкурируют с протонами за атом азота (серы, кислорода) в содержащих донорные атомы лигандах. Стерические особенности образуемых комплексов способствуют увеличению их проницаемости через клеточные мембраны и модулируют доступность подобных комплексов для разнообразных клеточных рецепторов. Токсичность многих лекарственных веществ, имеющих в составе молекул атомы азота, серы и кислорода, объясняется способностью хелатировать ионы металлов (см. гл. 7).

Многие токсиканты имеют в своих молекулах асимметрические атомы углерода и существуют в виде стереоизомеров, часто (но не всгда) проявляющих различную активность (токсичность). Энантиомер с более высоким сродством к рецептору называется *эутомером*, противоположный — *дистомером* (от греч. eu — хороший и dis — плохой). Левовращающий изомер адреналина (эутомер) в 15 раз активнее своего оптического правовращающего антипода (дистомера). Один из синтетических аналогов каннабиноидов (левовращающий изомер) проявляет в 4000 раз более высокую психотропную активность, чем его правовращающий энантиомер и приблизительно в 100 раз более высокую, чем природный (3R, 4R)(-)-Δ^1^-тетрагидроканнабинол (ТГК, см. гл. 6).

Известен *принцип трехточечного взаимодействия*: в рецепторе имеются три группировки атомов, благодаря которым возможно связывание комплементарных атомных групп (атомов) хирального токсиканта. Поэтому только один из энантиомеров может связываться с рецептором полностью (другой может объединиться с рецептором лишь двумя атомными группами).

Различный биологический эффект при взаимодействии рецептор–токсикант может наблюдаться при связывании либо с тремя, либо с двумя лигандами. Достоверно прогнозировать ожидаемую активность энантиомеров, рацематов, π-диастереомеров или других стереоизомеров, различных конформеров токсикантов можно только при изучении механизма образования связи с определенным рецептором или рецепторами.

Рецепторы и токсиканты могут изменять конформации друг друга. Конформации рецепторов (например, гликолипидных) клеточных мембран человека изменяются под действием токсикантов, например некоторых бактериальных токсинов. Взаимодействие токсина с нерецепторной частью гликолипида не вызывает конформационных изменений в мембране. Другие химически родственные гликолипиды могут инактивировать токсины, конкурентно ингибируя их связывание с рецепторными молекулами.

Конформационные изменения передают приносимую биополимерами информацию через клеточную мембрану. Одни токсиканты имеют жесткую структуру, а другие могут деформироваться под действием рецептора. В свою очередь, это может вызвать такую деформацию белкового рецептора, что токсикант входит в им же созданную в рецепторе полость («индукция соответствия»). Принцип «индукции соответствия» может как повышать, так и значительно снижать токсическое действие вещества.

Степень ионизации токсиканта (в той или иной среде организма) определяет его всасывание в определенных отделах желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), взаимодействие с катионными или анионными центрами рецепторов, проникновение через различные типы мембран, распределение в тканях и жидкостях организма, а также возможность выделения из биообъектов при ХТА (см. гл. 3 и 4). Она теоретически зависит от двух основных параметров: pH среды и p*K*~a~ токсиканта. При реальных значениях pH биожидкостей степень ионизации токсиканта зависит от многих факторов: липофильности, способности к специфической или неспецифической сольватации за счет диполь-дипольных или дисперсионных взаимодействий соответственно, поверхностной активности, окислительно-восстановительных превращений; комплексообразования с белками, металлами и др. (см. гл. 3 и 4). Взаимодействия токсикантов различной химической природы с определенными рецепторами обсуждаются во второй части книги при изложении характеристик отдельных групп токсичных веществ.

1.3. Классификация токсичных агентов

Настоящее различие – почти мысль,
настоящая классификация – почти теория.

Александр Васильевич Круглов (1852–1915),
русский писатель, поэт, журналист,

издатель, ученик Ф.М. Достоевского

Используют различные классификации токсичных веществ: общие, основанные на принципе, пригодном для всех химических веществ (например, по классу опасности), и специальные, отражающие связь между отдельными физико-химическими или другими свойствами веществ и проявлениями токсичности этих веществ.

Согласованная на глобальном уровне система классификации и маркировки химических веществ (СГС) разработана Международной организацией труда (МОТ), Организацией экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) и Организацией Объединенных Наций (ООН) на основе постановления Конференции ООН по окружающей среде и развитию (ЮНСЕД) в 1992 г. в Рио-де-Жанейро. В СГС предусматривается классификация химических веществ в зависимости от класса опасности и предлагаются согласованные элементы указания на опасность, включая маркировочные знаки и информационные карточки безопасности. Цель СГС — обеспечить наличие информации о физических опасностях и острой токсичности химических веществ, чтобы улучшить систему защиты здоровья людей и окружающей среды. СГС служит основой для согласования норм и правил, касающихся химических веществ, на национальном, региональном и мировом уровнях. Последняя редакция системы СГС была принята в 2002 г.
в Йоханнесбурге на Саммите ООН по устойчивому развитию.

1.4. Виды токсического действия

Науку часто смешивают со знанием.
Это грубое недоразумение.
Наука есть не только знание, но и
сознание, то есть умение
пользоваться знанием как следует.

Василий Осипович Ключевский (1841–1911),
выдающийся русский ученый-историк,
заслуженный профессор
Московского университета

Понятие о биологических маркерах

Биомаркер (биологический маркер) — это измеряемое содержание токсиканта или его метаболитов, находящихся в организме, а также событие, происходящее в биологической системе, отражающее воздействие токсиканта.

Определение индивидуальных реакций организма на воздействие токсиканта до получения достоверно фиксированных морфологических или токсикологических изменений способствует ранней диагностике повреждений, вызванных химическим веществом (см. гл. 2). Обычно выделяют три вида биологических маркеров: *биомаркеры воздействия, биомаркеры эффекта* и *биомаркеры чувствительности.*

Биомаркеры используют с целью:

* определения (или опровержения) негативного эффекта, вызванного токсикантом; * определения индивидуальной гиперчувствительности к конкретным химическим воздействиям и, таким образом, прогнозирования риска их применения; * оценки соблюдения требований охраны окружающей среды либо эффективности профилактических мероприятий (применительно к группам людей, подвергшихся воздействию токсиканта).

Биомаркеры воздействия и эффекта являются доклиническими индикаторами аномалий, между ними не существует четкого разграничения.

Биомаркеры воздействия

Биомаркер воздействия **—** это токсикант или его метаболиты, присутствующие в биосубстратах человека.

В качестве биомаркеров воздействия широко используются аддукты ДНК — продукты взаимодействия токсикантов или их метаболитов со структурными фрагментами ДНК. Аддукты ДНК могут быть обнаружены в клетках крови или тканей, а специфические фрагменты ДНК могут выводиться с мочой (см. гл. 2). Другие макромолекулы также могут образовывать аддукты или окисляться, например, при действии ряда токсикантов происходит образование аддуктов гемоглобина с аминокислотамиПри продолжительности жизни эритроцитов, равной 4 мес, в течение этого периода аддукты гемоглобина с аминокислотами будут служить индикаторами общего воздействия..

Современные аналитические методы (см. гл. 5) позволяют достоверно регистрировать биомаркеры воздействия в биологическом материале.

Биомаркеры эффекта

Биомаркер эффекта **—** это эндогенный компонент клетки или измерение нарушения функции органа (системы органов) или индикаторы нарушения гомеостаза организма или системы органов, на которые оказано воздействие.

Биомаркеры эффекта делят на специфические и неспецифические. *Специфические биомаркеры* указывают на биологический эффект конкретного воздействия (например, повышенное содержание карбоксигемоглобина в крови при вдыхании угарного газа, изменение содержания цинк-протопорфирина в эритроцитах при избыточном поступлении в организм соединений свинца и других, см. ниже и гл. 6–10).

Неспецифические маркеры не указывают на конкретную причину эффекта, но отражают общий, комплексный ответ организма. Например, о*ксидативный стресс*, который вызывают многие токсиканты различной химической природы, сопровождается изменением активности ряда ферментных систем и накоплением продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) (малонового диальдегида, β-микроглобулина и др.).

Белки теплового шока (БТШ) (стрессорные белки, или белки стресса) часто образуются в ответ на различные вредные воздействия, в том числе химические (см. гл. 2). Выведение с мочой белков с малой молекулярной массой, таких как альбумин, может быть использовано в качестве биомаркера ранней стадии поражения почек. Однако проявление нефротоксичности может сопутствовать действию гемато- или гепатоксикантов (см. ниже).

Качественные (выявление биомаркеров) и количественные характеристики метаболических процессов при действии конкретных токсикантов с учетом индивидуальных гено- и фенотипов являются практическими задачами современных технологий — *метаболомики и метабономики* (см. гл. 2).

Индивидуальные особенности организма обусловливают различные последствия воздействия малых доз потенциально вредных веществ для здоровья. Поэтому используют другой надежный (специфический) способ оценки эффекта воздействия токсиканта — генную диагностику, преимущества и трудности которой изложены в главе 2.

Примеры биомаркеров воздействия и биомаркеров эффекта, используемых в токсикологических исследованиях, приведены в табл. 1-1.

Таблица 1-1. Биомаркеры воздействия и биомаркеры эффекта, используемые в токсикологических исследованиях

Биопробы	**Объект определения**	**Цель исследования**
Биомаркеры воздействия		
Жировая ткань	Диоксин	Воздействие диоксина
Кровь	Свинец	Воздействие свинца
Кость	Алюминий	Воздействие алюминия
Выдыхаемый воздух	Толуол	Воздействие толуола
Волосы	Ртуть	Длительное воздействие ртути
Сыворотка крови	Бензол	Воздействие толуола
Моча	Фенол	Воздействие фенола

Биомаркеры эффекта		
Кровь	Карбоксигемоглобин	Воздействие оксида углерода(II)
Эритроциты	Цинк-протопорфирин	Воздействие свинца
Моча	Микроглобулины	Нефротоксическое воздействие токсиканта
Лейкоциты	Аддукты ДНК	Воздействие мутагенов
Сыворотка крови	Активность холинэстеразы	Воздействие фосфорорганических инсектицидов и карбаматов
Сыворотка крови	Активность* ферментов, принадлежащих к семейству цитохрома Р450	Воздействие органических растворителей (и многих других токсикантов)
Сыворотка крови	Содержание белка металлотионеина	Воздействие кадмия

* Активность ферментов определяют косвенно *in vivo* путем введения вещества, заведомо метаболизируемого конкретным ферментом, а затем продукт гидролиза идентифицируют в моче или плазме крови.

Биомаркеры чувствительности

Биомаркер чувствительности — это индикатор чувствительности человека к эффекту токсиканта, его метаболитов или группы подобных соединений.

Гиперчувствительность может быть вызвана как наследственными причинами, так и течением хронических и/или инфекционных заболеваний либо факторами окружающей среды. Особое внимание уделяется генетически обусловленной чувствительности. Например, окисление чужеродных химических веществ осуществляется главным образом ферментами, принадлежащими к семейству цитохрома Р450 (см. гл. 2 и 3). Другие ферменты путем конъюгации способствуют водорастворимости метаболитов (N-ацетилтрансфераза, глутатион-S-трансфераза и др.). Активность этих ферментов контролируется генетически и варьирует в широких пределах. Поэтому восприимчивость к воздействию конкретного токсиканта связывают с генетической предрасположенностью. Однако люди, страдающие хроническими заболеваниями, более чувствительны к действию профессиональных или экотоксикантов, чем здоровые. Если заболевание или предыдущее воздействие токсичных химических веществ вызвало субклиническое поражение органов, то сопротивляемость новым токсическим воздействиям будет ниже. В этом случае биохимические показатели функций органов могут быть использованы как биомаркеры восприимчивости. Индивидуальные привычки (курение, алкоголь) и принимаемые лекарства также могут вызывать повышенную восприимчивость к действию токсиканта. Например, при курении сигарет в организм обычно попадает значительное количество кадмия. У курильщика повышается риск развития заболеваний почек в случае профессионально обусловленного воздействия кадмия.

Существует ряд ограничений при выборе и использовании биомаркеров, а также интерпретации данных, полученных с их участием. В первую очередь это влияние генетических факторов. Многие биомаркеры были определены в опытах на животных, и токсико-кинетическая модель далеко не всегда может быть перенесена на человека (пример — трагические последствия использования талидомида). Применение биомаркеров нецелесообразно для оценки воздействия химических веществ с коротким жизненным циклом *in vivo*. Некоторые химические вещества могут депонироваться и длительное время не оказывать повреждающего действия либо оказывать воздействие на органы и системы, оценка которого с использованием биомаркеров затруднена [например, определенное воздействие на центральную нервную систему (ЦНС)]. Использование новых технологий (метаболомики, метабономики) направлено и на поиск новых биомаркеров (см. гл. 2 и 5). *Так, ученые выявили два специфических белка-биомаркера, возможно, способных помочь в диагностике психических заболеваний. Образцы цереброспинальной жидкости больных шизофренией и психическими расстройствами, в том числе вызванными рядом токсикантов, были исследованы с помощью тандемных методов ВЭЖХ-МС-МС-ЯМР*ВЭЖХ-МС-МС-ЯМР — высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием и ядерно-магнитный резонанс.^ ^*(см. гл. 5). Структура одного из маркеров установлена — это транстиретин (transthyretin).*

Очень важно знать путь введения токсиканта, который определяет наличие (преобладание) в биологических жидкостях тех или иных метаболитов токсиканта, эндогенных маркеров воздействия и влияет на интерпретацию

полученных результатов (см. гл. 4 и 5).

Все вышесказанное свидетельствует о необходимости учета многих факторов для адекватной интерпретации результатов и получения достоверных выводов при оценке степени воздействия ксенобиотиков. К таким факторам относятся знание закономерностей токсикокинетики, механизма взаимодействия между токсикантом и мишенью биосистемы, а, следовательно, структурно-функциональных особенностей органов и систем организма, наиболее активно участвующих в метаболизме ксенобиотиков и подвергающихся их сильному воздействию. Поэтому при изложении свойств отдельных токсикантов (см. гл. 6–10) будут обсуждаться и виды токсичности.

Гепатотоксичность

Гепатотоксичность — это свойство токсикантов при действии на организм немеханическим путем вызывать структурные и/ или функциональные нарушения печени.

Промышленные токсиканты, лекарственные средства, природные токсины, экотоксиканты, алкоголь, технические жидкости и многие другие ксенобиотики вызывают разнообразные по клиническим проявлениям и механизмам развития патологические изменения в печени, ранняя диагностика которых затруднена. Профилактика повреждений печени, вызываемых действием токсиканта, малоэффективна. Многие лекарственные средства способны вызывать разнообразные поражения печени, что является одной из наиболее распространенных причин изъятия из обращения ранее одобренных к применению лекарственных препаратов. Частота лекарственных поражений печени неодинакова в разных странах. В России острые медикаментозные поражения печени выявляются у 2,7% госпитализированных больных и чаще всего связаны с приемом противотуберкулезных, антибактериальных, аналгетических, гормональных, цитостатических, гипотензивных и антиаритмических средств. В Англии первое место в этиологии печеночной недостаточности занимает парацетамол. В США ежегодно острые отравления парацетамолом, требующие госпитализации, регистрируются с частотой 29 на 100 000 населения, в Израиле — 57, в Великобритании — 200 на 100 000 населения.

К сожалению, большинство токсических поражений печени протекает скрыто, клинически их трудно отличить от других заболеваний печени. Если лекарственное поражение печени вовремя не диагностировано и прием медикаментов продолжается, тяжесть поражения многократно возрастает. Смертность при токсических гепатопатиях достигает 5%, при отравлениях парацетамолом даже в невысоких дозах (4–12 г) — 19%.

Гепатотоксичность свойственна большому числу соединений различной химической природы (табл. 1-2).

Таблица 1-2. Гепатотоксиканты

Группа токсикантов	Токсиканты
Промышленные токсиканты	Алифатические углеводороды: гептан
	Ароматические углеводороды: бензол, дифенил, нафталин, стирол, толуол, ксилол
	Алифатические галогенированные углеводороды: хлороформ, дибромохлоропропан, дихлорэтан, дибромэтан, этилендибромид, этилендихлорид, метилбромид, метилхлорид, пропиленхлорид, тетрахлорэтан, тетрахлорэтилен, трихлорэтан, винилхлорид
	Ароматические галогенированные углеводороды: бензилхлорид, полихлорированные дифенилы, хлорбензол, хлорированные нафталины, полибромированные дифенилы
	Фенол и его производные: фенол, крезол, пирогаллол
	Алкоголи и их производные: аллиловый спирт, этиловый спирт, этиленхлоргидрин, гептиловый спирт, этиленгликоль
	Простые эфиры и эпоксисоединения: диоксан, эпихлоргидрин, этиленоксид, тиоловый эфир
	Карбоновые кислоты, их ангидриды и сложные эфиры: фталевый ангидрид, метилацетат, этилацетат, пропилацетат, изопропилацетат, бутилацетат, амилацетат, этилсалицилат
	Цианиды и нитрилы: ацетонитрил, акрилонитрил
	Алифатические амины: этаноламин, этилендиамин

	Ароматические амины: 2-ацетаминофлюран, 3,3´-дихлорбензидин, 4-диметиламиноазобензол, 4,4´-метиленбис-(2-хлоранилин)
	Нитропроизводные: нитрометан, 2-нитропропан, нитропарафины, нитробензол, динитробензол, динитротолуол, тринитротолуол, нитрофенол, динитрофенол, пикриновая кислота
	Азотсодержащие соединения различных классов органических веществ: диметилнитрозоамин, диметилформамид, гидразин и его производные, пиридин, диметилацетамид
	Неметаллы: бор, фосфор, мышьяк, селен
	Галогены: бром
	Металлы: бериллий, висмут, кадмий, хром, медь, германий, железо, никель, таллий, олово и др.
	Пестициды: дипиридилы (паракват, дикват), дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) и др.
	Соединения различной природы: фосфин, β-пропиолактон, сероуглерод, диметилсульфат, меркаптаны, тетраметилтиурамдисульфид
Природные токсины	Афлатоксины, охратоксины, рубратоксины, аманитин, фаллоидин и др.
	Бактериальные токсины: экзотоксины группы клостридиум, токсины гемолитического стрептококка, этионины и др.
Лекарственные средства	Анальгетики и нестероидные противовоспалительные средства: ацетаминофен, салицилаты, индометацин, ибупрофен, фенилбутазон и др.
	Анестетики: галотан, метоксифлюран, циклопропан и др.
	Антибактериальные средства: нитрофураны, сульфаниламидные препараты и др.
	Антибиотики: хлорамфеникол, рифампицин, тетрациклин и др.
	Антиконвульсанты: фенитоин, фенобарбитал, метадион и др.
	Сердечно-сосудистые средства: антикоагулянты, хинидин, прокаинамид, верапамил, нифедипин, метилдопа, каптоприл, диуретики, амиодарон и др.
	Противовирусные средства: видарабин и др.
	Противоопухолевые препараты: цитарабин (цитозар) и др.
	Противотуберкулезные средства: циклосерин, изониазид, *п*-аминосалициловая кислота и др.
	Протозооциды: эметин, метронидазол и др.
	Психотропные препараты: фенотиазины, тиоксантены, бутирофеноны, бензодиазепины, ингибиторы моноаминоксидазы, трициклические антидепрессанты и др.
	Фунгициды: гризеофульвин, амфотерицин В, 5-флюороцитозин и др.
	Разные: колхицин, аллопуринол, циметидин, дисульфирам, витамин А, 2,3-димеркаптопропанол, или британский антилюизит, пеницилламин и др.

Большой перечень только классов химических веществ, обладающих гепатотоксичностью, вполне объясним. Печень — основной орган, ответственный за биотрансформацию абсорбированных во внутреннюю среду ксенобиотиков. Биотрансформация токсикантов осуществляется посредством химических реакций различного механизма действия (см. гл. 3), следствием которых нередко является повреждение печени.

Вещества, вызывающие поражение печени, можно разделить на две группы.

* Облигатные гепатотоксиканты — вещества, вызывающие дозозависимый эффект, воспроизводимый в опытах на экспериментальных животных. Прогнозируемая и зависимая от дозы токсичность характерна для веществ, которые метаболизируются in vivo с образованием не менее токсичных метаболитов. Такой тип токсичности проявляется при приеме вещества в дозе, превышающей емкость систем биотрансформации (передозировка, дефицит субстратов конъюгации и коферментов, ферментов, необходимых для детоксикации), а также под влиянием индукторов и/ или ингибиторов ферментов (см. гл. 3). * Идиосинкратические гепатотоксиканты — вещества, повреждающие печень у чувствительных к определенным соединениям индивидуумов. Эффект не воспроизводится в эксперименте и не носит дозозависимый характер. Идиосинкратическая гепатотоксичность непредсказуема, связана с образованием гаптенов, вызывающих иммунное

поражение печени у чувствительных лиц, и не зависит от дозы введенного вещества. Молекулярной основой идиосинкратической гепатотоксичности могут быть различия в активности метаболизирующих ферментов, дефекты иммунной системы и так далее, например, генетически обусловленные низкий уровень цитохрома P4502D6 и/ или дефицит ферментов конъюгации, в частности изоферментов M1 и T1 глутатион-S-трансферазы. Идиосинкратическая гепатотоксичность сопрождается системными проявлениями гиперчувствительности: высыпаниями, лихорадкой, эозинофилией — и отличается быстрой регрессией симптомов после прекращения взаимодействия с токсикантом. Аллергическая гепатопатия далеко не всегда развивается на фоне системных проявлений (например, аминазин, эритромицин, галотан, изониазид, вальпроевая кислота не дают системных реакций). Часто идиосинкратические поражения печени регистрируют у лиц, работающих на химических и фармацевтических производствах.

Патологические состояния печени, обусловленные действием химических веществ различной природы, классифицируют как цитотоксические или холестатические.

* Цитотоксические повреждения печени проявляются некрозом, стеатозом, канцерогенезом. * Холестатические повреждения печени дают о себе знать нарушением секреции желчи, развитием желтухи.

Часто поражения печени химической этиологии имеют смешанную форму. Предшествующие повреждения печени алкоголем повышают чувствительность к гепатотропным ядам. Токсический эффект усиливается при вирусной и бактериальной инфекции, дефиците белков в пище. Типы поражения печени зависят от природы химического вещества и продолжительности действия.

Различают прямое и опосредованное действие токсикантов на печень.

* Прямое действие реализуется посредством: нарушения транспорта веществ через мембраны гепатоцитов и клеточных органелл; повреждения систем энергообеспечения клеток печени; нарушения обмена нуклеиновых кислот в ядрах клеток; нарушения экскреции из гепатоцитов естественных метаболитов; повреждения органелл клеток печени. * Опосредованное действие наблюдается редко. Например, при интоксикации кадмием активируется уреаза, катализирующая гидролитическое расщепление мочевины на аммиак и углекислый газ. Каждая молекула уреазы связана с двумя ионами никеля. Кадмий, образуя координационное соединение с аммиаком, сдвигает равновесие реакции вправо, что приводит к активации уреазы. Кроме того, ионы кадмия, замещая ионы никеля, высвобождают их. Ионы никеля активируют ферменты, катализирующие гидролиз глутамина с образованием аммиака, который проявляет гепатотоксическое действие. Ионы Ni^2+^, Cd^2+^ индуцируют перекисное окисление липидов (ПОЛ), подавляют репарацию ДНК и запускают синтез противовоспалительного цитокина TNF-α, вызывающего апоптоз и некроз клеток-мишеней.

Механизм стимуляции аутоиммунных процессов, развивающихся вследствие взаимодействия токсиканта с макромолекулами белка клеток печени, изучен недостаточно (например, повреждение печени при хроническом алкоголизме).

Гематотоксичность

Кровь — особая разновидность ткани мезенхимного происхождения, образующая вместе с лимфой внутреннюю среду организма.

Основные функции крови:

* транспортная (перенос веществ, получаемых с пищей, продуктов обмена, гормонов и других биологически активных веществ); * дыхательная (доставка O~2~ от органов дыхания к тканям и удаление CO~2~ из организма); * гомеостатическая (обеспечение совместно с нервной и эндокринной системами постоянства внутренней среды: регуляция водно-солевого обмена, сохранение кислотно-щелочного баланса в организме, поддержание постоянной температуры тела); * защитная (обеспечение гуморального и клеточного обмена).

Гематотоксичность — это свойство токсикантов при действии на организм немеханическим путем избирательно нарушать функции клеток крови или ее клеточный состав.

Виды гематотоксичности представлены в табл. 1-3.

Таблица 1-3. Виды гематотоксичности

Вид гемато-токсичности	Краткое описание
Нарушение гемопоэза: гиперпластические состояния	Выражены при лейкозах и эритремии. Клетки костного мозга утрачивают способность дифференцироваться, а их пролиферация может быть замедлена. Продолжительность жизни незрелых элементов увеличивается, в кроветворных органах и крови накапливаются клетки различных линий и различной степени зрелости
гипо- и апластические состояния	Обедненность костного мозга кроветворными клетками. Поражаются либо родоначальные кроветворные клетки, либо наиболее ранние клеточные формы эритро-, грануло- и тромбоцитопоэза. В крови уменьшается количество эритроцитов (уровень гемоглобина), лейкоцитов (гранулоцитов), тромбоцитов (гипо- и апластические анемии, агранулоцитозы, метастазы опухолей в костный мозг и др.). Симптоматика: вначале уменьшается количество гранулоцитов и снижается устойчивость к инфекциям, позднее присоединяется тромбоцитопеническая кровоточивость, в последнюю очередь снижается количество эритроцитов (бледность, слабость и одышка при нагрузке)
Изменение числа форменных элементов: гемолитические анемии	В патогенезе значительна роль химического фактора. Реализуются различные способы повреждений: разрушение мембраны эритроцитов; образование метгемоглобина; атаки антителами (IgG) в присутствии комплемента измененных мембран эритроцитов; образование антигена: комплекс токсикант — белок плазмы крови (в присутствии антител IgM и комплемента) после фиксации на мембране эритроцитов вызывает их гемолиз
аплазия костного мозга	Снижается количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, развивается панцитопенический синдром: слабость и усталость (вследствие анемии), лихорадка, инфекционные осложнения (результат нейтропении), кровотечения (результат тромбоцитопении). В костном мозге мало клеточных элементов (преимущественно лимфоциты и ретикулярные клетки). Отмечаются жировое перерождение костного мозга, фиброз. В крови снижено количество эритроцитов (менее 2 · 10^6^ в 1 мм^3^), количество лейкоцитов (1500 и менее в 1 мм^3^), лимфоцитоз, тромбоцитопения
лейкемии*	Острая миелоидная лейкемия, хроническая миелоидная лейкемия, острая лимфоидная лейкемия, хроническая лимфоидная лейкемия. Трудно установить взаимосвязь между действием токсиканта и возникновением лейкемий
тромбоцитопении	Геморрагический синдром (петехии, пурпура, геморрагические пузыри на слизистой оболочке полости рта, желудочно-кишечные и другие кровотечения различной степени тяжести), анемия. Количество тромбоцитов снижается до 1000 и менее в 1 мм^3^ (в тяжелых случаях), в костном мозге число мегакариоцитов снижается незначительно
агранулоцитоз	Количество лейкоцитов снижается до 500–300 в 1 мм^3^ крови, гранулоцитопения (менее 2% общего количества лейкоцитов), лимфоцитоз. В костном мозге снижено количество клеток миелоидного ряда, нейтрофильных метамиелоцитов и миелоцитов. Клинически: некротические поражения слизистой оболочки ротовой полости, некротическая ангина как инфекционные осложнения вплоть до развития сепсиса
Нарушение функций гемоглобина: образование метгемоглобина; образование карбоксигемоглобина	В крови содержится около 14–16 г гемоглобина. Транспорт кислорода осуществляется гемоглобином (эритроциты переносят 20 мл O~2 ~на 100 мл крови, плазма — 0,2 мл O~2~ на 100 мл крови). Нарушение транспорта кислорода связывают с образованием метгемоглобина или карбоксигемоглобина при действии ряда токсикантов

* Успехи молекулярной медицины и биологии позволили на основе результатов фено- и генотипического анализа изменить классификацию миелоидных и лимфоидных лейкемий, значительно увеличить число их подтипов. Во многих случаях нельзя воспользоваться результатами прежних исследований по установлению причинно-следственных связей между природой вещества и проявлениями гематотоксичности без детализации диагноза заболевания крови.

Снижение числа форменных элементов одного типа при интоксикациях встречается редко. Например, гранулоцитопения (агранулоцитоз) может возникнуть при химиотерапии цитостатиками, антибиотиками (левомицетином), противовоспалительными средствами (бутазолидином). Апластическую анемию, лейкемию, агранулоцитоз, тромбоцитопению токсического происхождения констатируют в случаях, когда сокращение количества определенного типа клеток является основным признаком отравления.

В табл. 1-4 приведены примеры химических соединений, способных проявлять гематотоксичность.

Таблица 1-4. Гематотоксиканты

Гематотоксиканты	Примечание
Анилин, его метаболиты и производные	Основной метаболит ароматических аминов — ФГА^1^ — ответствен за образование MetHb, повреждение мембран эритроцитов и развитие гемолитической анемии
Антипирин и его производные	Могут наблюдаться гранулоцитопения и агранулоцитоз
Антибиотики: левомицитин, цитостатического действия (актиномицин, оливомицин, пуромицин)	Могут наблюдаться тромбоцитопения, лейкопения, агранулоцитоз, апластическая анемия. Не рекомендуется назначать одновременно с лекарственными средствами, угнетающими функцию кроветворения (сульфаниламидами, цитостатиками). Чувствительны лица с дефицитом глутатионредуктазы и Г-6-ФДГ-6-ФДГ^2^
Ароматические углеводороды, их метаболиты, нитро- и галогенопроизводные	Высокая активность в гранулоцитарных элементах костного мозга фермента миелопероксидазы, катализирующего окисление метаболита бензола — гидрохинона — в 1,4-бензохинон, сопровождается свободнорадикальными процессами в клетках. Хроническое действие в концентрациях более 100 ppm связано с нарушениями гемопоэза и иммунной системы (лейкопения, тромбоцитопения, лимфоцитопения, панцитопения). Уменьшение числа форменных элементов в крови часто происходит на фоне гиперплазии костного мозга с признаками задержки созревания клеточных элементов эритроидного и миелоидного ряда. Действует на клетки костного мозга, находящиеся в фазе *G*2 митоза, а в сублетальных дозах — на клетки в периоде клеточного деления (см. гл. 7)
Бутадиен-1,3	Гематологические изменения при длительном воздействии: лейкопения, нейтропения, тромбоцитопения, гемолитическая анемия, гипотромбинемия (редко)
Водород мышьяковистый (арсин)	Сопровождается снижением содержания глутатиона в эритроцитах, угнетением эритроидного ростка костного мозга. Возможен токсический отек легких. Чувствительны лица с дефицитом глутатионредуктазы и Г-6-ФДГ (см. гл. 7)
Водород сурмянистый (стибин)	Сопровождается вторичным поражением печени и почек: гематурией, тошнотой, рвотой, желтухой, шоком, признаками острой почечной недостаточности (см. гл. 7)
Галогенопроиз-водные углеводородов алифатического ряда	См. производные ароматических углеводородов
Гидразин, метилгидразин и его производные, фенилгидразин	Чрезвычайно токсичные соединения, вызывающие нейтрофильный лейкоцитоз, лимфопению, эозинопению. При остром отравлении вначале увеличивается количество эритроцитов и гемоглобина, в последующем оно уменьшается в связи с гемолизом. Гидразин оказывает влияние на свертывающую систему крови, вызывая инактивацию фактора VIII (так называемого антигемофилического глобулина). Чувствительны лица с дефицитом глутатионредуктазы и Г-6-ФДГ

Гидроксиламин, ФГА	См. анилин
Дапсон, диами-нодифенилсульфон и другие сульфоны	Чувствительны лица с дефицитом глутатионредуктазы и Г-6-ФДГ. Развиваются как метгемоглобинемия, так и сульфгемоглобинемия, гемолиз (спустя 1 нед после интоксикации), анемия
Лекарственные вещества алкилирующего действия	Вероятность возникновения (до 20%) вторичной острой миелоидной лейкемии зависит от доз цитостатика и дополнительного облучения
Соединения, содержащие в ионной форме: медь	При остром пероральном отравлении обнаружение гемоглобина в плазме крови и моче, снижение резистентности эритроцитов, гемолитическая анемия, сульфгемоглобинемия, билирубинемия
свинец	Угнетение эритропоэза вследствие нарушения процесса синтеза гема, опосредованное подавление активности дегидрогеназы σ-аминолевулиновой кислоты и/ или повреждение мембраны эритроцитов (снижение устойчивости эритроцитов). Обнаружение порфирина в моче — поздний признак интоксикации. Диагностические признаки хронической интоксикации — наличие в моче σ-аминолевулиновой кислоты, в плазме крови повышенный уровень свинца. Анемия различной степени тяжести
другие	См. гл. 7
Метиленовый синий	Чувствительны лица с дефицитом глутатионредуктазы и Г-6-ФДГ. В зависимости от дозы — препятствует или способствует образованию метгемоглобина (см. выше)
Соединения мышьяка	При острой интоксикации нарушение созревания миелобластов, проявляющееся лейкопенией, при хронической интоксикации развитие лейкемий. Диагностический признак — обнаружение элемента в плазме крови и моче в 1-е сутки (см. гл. 7)
Нитриты, нитраты*	Нитриты — активные метгемоглобинообразователи; группа риска — лица, имеющие дефицит глутатионредуктазы и Г-6-ФДГ. Нитраты восстанавливаются в нитриты в печени (при участии системы глутатион–нитратредуктаза) и ЖКТ (при участии *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* и др.). Факторы, ускоряющие восстановление нитратов: повышенное значение pH среды в желудке, активность микрофлоры в ЖКТ, недостаточная реакционная способность системы НАД^+^– НАДН — метгемоглобинредуктаза. Отравление сопровождается гемолизом и гемолитической анемией (см. гл. 7)
Нитрофураны	Противопоказаны при дефиците Г-6-ФДГ и новорожденным в связи с незрелостью ферментных систем и связанным с этим риском возникновения гемолитической анемии
Озон	Биологические свойства озона нельзя рассматривать как специфические, ибо они проявляются при участии моментально образующихся продуктов озонолиза других веществ
Оксид углерода (II) и карбонилы металлов	Образование HbCO в крови (см. гл. **7)**
Хлорсодержащие пестициды (ХОП) (альдрин, дильдрин, эндрин, гексахлорбензол, токсафен, мирекс, хлордан, гептахлор, ДДТ)	Высокотоксичные, стойкие (см. гл. 7). Например, под влиянием ультрафиолетовых (УФ) лучей более 90% гептахлора превращается в эпокись гептахлора — соединение, которое во много раз токсичнее исходного и является канцерогеном
Пиридин и его производные	Вызывают замедление скорости оседания эритроцитов, сдвиг лейкоцитарной формулы влево
Природные токсины	См. гл. 10
Сульфаниламиды	Чувствительны лица с дефицитом глутатионредуктазы и Г-6-ФДГ. Возможно развитие лейкопении (см. анилин)

Фенолы, аминофенол и его производные, пирогаллол, гидрохинон	Органами-мишенями у человека для фенола и крезолов, поступивших в организм пероральным путем, являются кровь и почки; снижается функциональная активность лейкоцитов, наблюдается эритропения. В эксперименте в зависимости от дозы фенола в костном мозге животных интенсивность созревания эритробластов или снижается или возрастает (см. гл. 7)
Хлорат (бромат) калия (натрия)	См. гл. 7
Этиленоксид	Мутаген, цитотоксикант; может вызвать лейкемии различных типов
Эфиры этиленгликоля	Анемии, гранулоцитопения. В костном мозге (при нормальных показателях периферической крови) признаки миелоидной гипоплазии, повреждения стромы костного мозга, сидеробластоз (см. гл. 7)

* Известны токсикомании, обусловленные пристрастием к ингаляции летучих нитросоединений.

^1^ ФГА — фенилгидроксиламин.

^2^ Г-6-ФДГ — гексозо-6-фосфатдегидрогеназа.

Нефротоксичность

Нефротоксичность может быть следствием как прямого воздействия токсикантов и/ или их метаболитов на клеточные структуры почки или мочевого пузыря, что сопровождается выделением специфических биомаркеров, связанных с поврежденным сегментом, так и опосредованного действия химических веществ.

Нефротоксичность — это свойство токсикантов при действии на организм немеханическим путем вызывать структурно-функциональные нарушения почек.

Причины, которые вызывают повреждение почек, могут иметь преренальный (нарушение гемодинамики — снижение гемоперфузии почек и др.), ренальный (повреждение ткани почек) или постренальный (закупорка дистальных канальцев нефрона) характер.

К органам мочевой системы относятся почки, мочеточники, мочевой пузырь и мочеиспускательный канал. Почки — мочеобразующие органы, остальные — мочевыводящие пути.

В табл. 1-5 приведены вещества, вызывающие острую и хроническую почечную недостаточность.

Особую роль в оценке токсического действия вещества играет индивидуальная восприимчивость человека, т. е. генетическая основа дифференциальной реакции на химические вещества, содержащиеся в лекарствах, пище и загрязнителях окружающей среды. Получение достоверной информации о генетически предопределенном многообразии ферментов, участвующих в метаболизме токсикантов, позволяет надежно оценивать токсический риск, связанный с применением многих лекарств или других ксенобиотиков (см. гл. 2). Однако на практике пока часто используют разнообразные, но неспецифичные тесты: определение плотности и pH мочи, содержание сахара в крови и моче, оценка скорости гломерулярной фильтрации по концентрации креатинина и мочевины в крови, клиренса креатинина, инулина, меченных изотопами соединений, определение состояния канальцевых функций, микроскопия мочи и др.

Таблица 1–5. Вещества, вызывающие острую и хроническую почечную недостаточность

Металлы и их соединения*	**Органические растворители, реактивы и технические жидкости***	**Лекарственные препараты**	**Вещества, относящиеся к другим группам**
Бериллий	Бензидин	Антибиотики: цефалоспорины, аминогликозиды, пенициллины, тетрациклины и др.	Арсин и другие соединения мышьяка (см. гл. 7)

Висмут	Бромобензол	Антигипертензивные	Контрастные вещества для радиографии
Золото	2-Бромоэтиламин	Метоксифлуран	Малеиновая кислота
Кадмий	Гексахлорбутадиен-1,3	Мочегонные	Наркотики различных групп (амфетамины, героин и др.) (см. гл. 6)
Литий	Диоксан	Ненаркотические анальгетики и НПВП**	Оксид углерода(II) (см. гл. 7)
Медь	Дихлорацетилен Дихлорэтан, трихлорэтилен	Нитрофураны и их производные	Пестициды: бромометан, паракват и др. (см. гл. 7)
Платина	Метанол	Противоопухолевые средства (цисплатин)	Природные токсины: аманитин, кантаридин, рицин, фалоидин и др. (см. гл. 10)
Ртуть	Стирол	Производные ацетилсалициловой кислоты	Производные нитрозомочевины
Свинец	Толуол	Пуромицин	Силикон
Серебро	Хлороформ	Слабительные	Тартраты
Таллий	Четыреххлористый углерод	Сульфаниламиды	Фториды (см. гл. 7)
Хром	Эпихлоргидрин	Фторохинолоны	Оксалаты (см. гл. 7)
Уран	Этиленгликоль и его производные	Эрготамин и его производные	–

* См. гл. 7.

** Нестероидные противовоспалительные препараты.

Необходимость диагностики субклинических форм почечной патологии химической этиологии повсеместно признается врачами-токсикологами, экологами, профпатологами как актуальная задача профилактики острой и хронической почечной недостаточности. Дальнейшее развитие и широкое использование новых технологий — метаболомики и метабономики (см. гл. 2 и 5) сделает эту задачу выполнимой.

Дерматотоксичность

Кожа образует внешний покров тела и составляет около 20% общей массы человека. К производным кожи относят волосы, ногти, потовые, сальные и молочные железы. Кожа состоит из двух частей: эпителиальной (эпидермис) и соединительнотканной (дерма с сосочковым и сетчатым слоями). Гиподерма — подкожная жировая клетчатка — соединяет кожу с нижележащими тканями и состоит из рыхлой сети коллагеновых, эластических и ретикулярных волокон, в петлях которых располагаются дольки жировой ткани — скопления крупных жировых клеток.

Дерматотоксичность — это свойство токсикантов при действии на организм немеханическим путем вызывать повреждение кожных покровов.

Кожа выполняет ряд чрезвычайно важных физиологических функций, к которым относятся:

* защита организма от неблагоприятных внешних воздействий, в том числе микробного; * участие в водно-солевом, белковом, углеводном и жировом обмене; * участие в тепловом обмене с внешней средой (82% тепловых потерь происходит через поверхность кожи); * участие в процессе дыхания (за 1 сут выводится около 2% CO~2~, в 2 раза больше водяных паров, чем через легкие, поглощается около 1% всего вдыхаемого O~2~); * участие в синтезе витамина D под действием УФ-лучей; * депонирование крови (в сосудах кожи взрослого человека до 1 л крови).

Токсиканты могут воздействовать на кожу непосредственно при контакте и вызывать контактный дерматит или проникать в кожу через кровь при других (кроме трансдермального) способах введения, вызывая токсидермию.

Контактный дерматит может быть обусловлен как иммунными, так и неиммунными механизмами. В первом случае говорят об аллергическом контактном дерматите, во втором — о простом контактном дерматите. Контактный дерматит составляет 10% всех кожных болезней и более 90% профессиональных кожных болезней. Простой контактный дерматит встречается гораздо чаще, чем аллергический. Контактный дерматит могут вызвать фототоксические и фотоаллергические реакции, при которых поражение кожи возникает под действием химического вещества или аллергена и солнечных лучей.

Простой контактный дерматит обусловлен прямым повреждением эпидермиса. Из поврежденных клеток высвобождаются медиаторы воспаления и факторы хемотаксиса, вызывающие расширение сосудов (эритема), выход жидкости в дерму и эпидермис (отек и волдырь) и клеточную инфильтрацию. В пораженном участке сначала выявляется лимфоцитарная, затем нейтрофильная инфильтрация. Наблюдается внеклеточный и внутриклеточный отек эпидермиса. Простой контактный дерматит, вызванный однократным воздействием на кожу едкого вещества, например сильной кислоты или щелочи, называют *химическим ожогом*. При химическом ожоге воспаление развивается в течение нескольких минут или часов. Более легкая форма простого контактного дерматита возникает при многократном воздействии слабого раздражающего вещества, например моющего средства, и может проявиться через несколько недель или месяцев после первого контакта с этим веществом. Некоторые вещества могут вызывать как простой, так и аллергический контактный дерматит.

Аллергический контактный дерматит обычно обусловлен аллергическими реакциями замедленного типаВ отличие от других типов аллергических реакций, в аллергических реакциях замедленного типа антитела не участвуют. Эти реакции обусловлены взаимодействием Т-лимфоцитов с антигеном., которые могут возникать при непосредственном контакте кожи с аллергенами. Аллергические реакции замедленного типа развиваются лишь на вещества с молекулярной массой более 5000 Д, а неповрежденный роговой слой эпидермиса проницаем только для веществ, молекулярная масса которых не превышает 500 Д. Поэтому, чтобы вызвать аллергическую реакцию замедленного типа, низкомолекулярные вещества должны связаться с тканевыми белками и образовать антиген, который после взаимодействия с внутриэпидермальными макрофагами (клетками Лангерганса) подвергается атаке Т-лимфоцитов. Стимулированные антигеном Т-лимфоциты секретируют интерлейкин-2 (фактор роста Т-клеток), который индуцирует их пролиферацию. Активированные Т-лимфоциты мигрируют по лимфатическим сосудам в регионарные лимфатические узлы. Часть Т-лимфоцитов принимает участие в иммунном ответе, остальные превращаются в клетки иммунологической памяти — Т-клетки памяти. После первого контакта с аллергеном происходит накопление распознающих его Т-лимфоцитов, которое длится обычно 10–14 сут. После этого Т-лимфоциты выходят из регионарных лимфатических узлов в кровь и заселяют все периферические органы иммунной системы. При повторном контакте с аллергеном происходит активация Т-клеток памяти и более быстрое накопление клеток-эффекторов аллергической реакции замедленного типа — макрофагов и лимфоцитов CD4 и CD8Т-лимфоциты подразделяются на ряд подклассов. Главные из них — две различные неперекрывающиеся субпопуляции: клетки одной из них несут маркер CD4 (Т-хелперы) и в основном помогают в осуществлении иммунного ответа или индуцируют его; клетки другой несут маркер CD8 и обладают преимущественно цитотоксической активностью (Т-киллеры). Как правило, распознавание антигена Т-клетками происходит только при условии его презентации на поверхности других клеток в ассоциации с молекулами МНС (главный комплекс гистосовместимости; от англ. major histocompatibility complex). МНС — это группа генов и кодируемых ими антигенов клеточной поверхности, которые играют важнейшую роль в развитии иммунного ответа. При повторном воздействии антигенов клетки Лангерганса становятся клетками-мишенями для Т-киллеров, что приводит к разрушению клеток Лангерганса и выделению ими простагландинов, лизосомальных ферментов и других медиаторов воспаления..

Фототоксические и *фотоаллергические реакции*. По патогенезу фототоксические реакции сходны с простым контактным, а фотоаллергические — с аллергическим контактным дерматитом. Однако для развития фототоксических и фотоаллергических реакций необходимо действие УФ-излучения. Вещества, вызывающие фототоксическую реакцию, под действием УФ-излучения расщепляются с образованием токсичных продуктов, а вещества, вызывающие фотоаллергическую реакцию, связываются с эндогенными белками-носителями. Фототоксические и фотоаллергические реакции проявляются такими же гистологическими изменениями, как простой и аллергический контактный дерматит.

Основной механизм развития *токсидермии* аллергический, реже встречается токсическая реакция (например, на недоброкачественные продукты питания, препараты ртути, мышька).

При токсидермии наблюдаются повышение активности δ-аминолевулиновой кислоты и тирозиназы, образование реакционноспособного промежуточного соединения фермента с порфириногеном, вызывающего порфирию, изменение обмена глюкокортикоидов, повышение активности гормонов этой группы, сенсибилизация к их действию соответствующих цитозольных и ядерных рецепторов тканей организма, избыточный синтез кератогиалина.

Причиной развития токсикодермии являются продукты питания, химические вещества (производственные и бытовые), обладающие аллергенными и/ или токсическими свойствами и поступающие в организм главным образом через пищеварительный тракт или дыхательные пути, либо лекарственные препараты, которые могут быть введены внутривенно, внутримышечно, подкожно, внутривагинально, уретрально, ректально (табл. 1-6).

Таблица 1-6. Облигатные и факультативные токсиканты, вызывающие токсикодермию

Облигатные токсиканты	**Факультативные токсиканты**
Дифенилы полихлорированные	Лекарственные препараты: антипирин, салицилаты (аспирин), пенициллин, стрептомицин, синтомицин, биомицин, сульфаниламиды и др.
Дибензодиоксины полихлорированные	Соединения мышьяка
Дибензофураны полихлорированные	Соединения ртути
Иприты	Соединения таллия
Тетрахлороазобензол, тетрахлороазооксибензол	Соединения свинца
Хлоронафталены	Соединения висмута

Примечание. Облигатные токсиканты — вещества, вызывающие поражение кожи у всех лиц, контактирующих с ними; факультативные токсиканты — вещества, вызывающие поражение кожи у лиц с повышенной индивидуальной чувствительностью, возникающей, как правило, при длительном контакте с веществом.

Способы детоксикации

«Все заболевания есть отравления, лечение — антидотная терапия», — кредо медицины Средних веков. «Antidotarium of Nieolaus» — первый аналог современной фармакопеи; в XVII столетии «Antidota Specifia» — настольная книга европейского врача.

В настоящее время вместо господствующего в 50-х годах XX в. антидотного принципа лечения отравлений разработан комплексный метод эфферентной терапии и стимуляции естественной детоксикации организма. Характерные особенности течения отравления, механизмы формирования эндотоксикоза в токсикогенной стадии острых отравлений, а также результаты клинико-токсикологического анализа биологических сред являются основой для выбора врачом-токсикологом метода лечения и вещества (при необходимости), используемого в качестве детоксиканта (антидота).

Глава 2. От генома к метаболому
2.1. Рецепторные комплексы как молекулярные мишени

Научные факты составляют
главное содержание научного
знания и научной работы.

Владимир Иванович Вернадский (1863–1945),
выдающийся российский и советский
ученый-естествоиспытатель, создатель науки
биогеохимии, мыслитель и общественный деятель

Учение без размышления бесполезно,
но и размышление без учения опасно.

Конфуций (551–479 гг. до н.э.),
великий древнекитайский мыслитель и философ,
основатель базового традиционного
учения Китая — конфуцианства

В апреле 2022 г. ученые опубликовали результаты секвенирования, или «прочтения» последних 8% (а это 151 млн пар нуклеиновых оснований!) генома человека, которые оставались еще неизученными и рядом исследователей даже назывались как «мусорная ДНК». Оказалось совсем не так! В результате появилось новое понимание того, как делятся клетки, а следовательно, и ключ к изучению причин ряда тяжелых заболеваний. Расшифровкой занимались ученые из более чем 30 стран, включая Россию. Так, канд. биол. наук И. Александров и группа ученых под руководством Е. Рогаева внесли значительный вклад в изучение центромер, играющих важную роль в процессе деления ядра клетки и в контроле экспрессии генов.

«Внешние факторы сами по себе не создают в организме специфических изменений. Но последние возникнут с неизбежностью, когда внешний фактор найдет себе специфическое, т. е. адекватное, функциональное и морфологическое, преломление. Этим именно путем в организме возникли и закреплялись те или иные структуры и приспособительные устройства», — писал один из основоположников русской школы патологической анатомии академик И. В. Давыдовский (1962). Организм — сложная динамическая полилигандная и полиметаллическая система, для функционирования которой необходимо поддержание металлолигандного гомеостаза (МЛГ). Токсиканты — химические факторы нарушения гомеостаза. Изменение экспрессии генов далеко не всегда является результатом непосредственного взаимодействия токсикантов с ДНК, гораздо чаще это результат взаимодействия химических агентов с белками. Модификации белков влияют на белковые сигнальные цепи и факторы транскрипции, которые регулируют экспрессию генов. Таким образом, внешние факторы, изменяющие функции белков, сказываются на экспрессии генов.

Современные технологии дали возможность проводить одновременно анализ экспрессии тысяч генов и облегчили изучение клеток как систем, состояние которых определяется общей экспрессией всех генов. Изменения экспрессии генов отражают в дальнейшем изменения и в протеомах.

Протеом — это сумма всех протеиновых молекул, сформированных в клетке на определенный момент времени, или набор белков данной клетки в данной фазе ее развития в определенный момент времени (по аналогии с геномом — совокупностью всех человеческих генов).

Первоначальные представления о том, что один ген отвечает за синтез одного белка, оказались ошибочными. Один ген может отвечать за синтез ряда белков, который осуществляется или через альтернативный сплайсингСплайсинг (сшивание, сращивание) — процесс вырезания интронов («ненужных» участков молекулы РНК) и сращивания экзонов (участков ДНК, несущих информацию о строении белка) при образовании иРНК. Осуществляется специальными ферментами., или через посттрансляционные модификации. Протеом — понятие динамическое, тогда как геном стабилен и постоянен, иначе было бы невозможно передать наследственные свойства от поколения к поколению, обеспечить сохранение видов и т.д. Проявления внезапных реакций могут наблюдаться только на уровне протеома. Определить функциональную роль отдельных белков путем экспериментального сопоставления их качественного и количественного состава в клетке на разных стадиях и в разных состояниях ее развития, установить взаимосвязи между структурой белка и его функциями — грандиозная задача. По приблизительному подсчету, число возможных белков у человека лежит между 1 и 100 млн. Протеины могут взаимодействовать друг с другом, и число таких взаимодействий не поддается подсчету.

В 1998 г. N. G. Anderson писал: «ДНК — это на самом деле не нижняя точка: любой современный учебник биологии объясняет, что протеины определяют активную жизнь клетки, в то время как нуклеиновые кислоты представляют собой только план этой активности».

Проект «Геном человека» длился более 30 лет (1990–2022). Основная версия, названная Build35, закончена в 2004 г. Число белок-кодирующих генов у человека 20 000–25 000 (принято считать — 24 000), что меньше,

чем предсказывалось раньше (от 30 000 до 40 000 генов). В результате картирования генома человека создан атлас последовательности нуклеотидов геномной ДНК человека (референтная последовательность) и собраны базы данных:

* о последовательности нуклеотидов транскрибируемых участков ДНК (EST database, EST — Expressed Sequence Tags); * положении и содержании отличий (полиморфизмов, т. е. нуклеотидных замен) других известных последовательностей ДНК человека от референтной последовательности (SNP database, SNP — Single Nucleotide Polymorphism).

Но белками все не исчерпывается. Проект «Геном человека» доказал, что существует, кроме матричных, транспортных и рибосомальных РНК (рибонуклеиновая кислота), еще множество типов некодирующих РНК которые, в свою очередь, подразделяются на инфраструктурные (о них известно из курса биологии) и регуляторные, выполняющие весьма важные для жизни функции.

Расшифровка генома человека привела к возникновению ряда научных направлений принципиально нового характера, получивших собирательное название «постгеномные технологии». К постгеномным технологиям относятся геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика, биоинформатика и нанобиотехнология.

В 2010 г. был запущен проект «Протеом человека», который должен составить полный список человеческих белков.

Протеомика — это совокупность технологий, позволяющих определить число и структуру синтезированных организмом белков, последовательность взаимодействий белок–белок и посттрансляционные модификации последовательности белок–другая молекула внутри клетки.

В течение жизни клетки практически каждый белок при своем функционировании взаимодействует со множеством макромолекул, а также низкомолекулярных лигандов. Взаимодействие белок–белок крайне важно для жизнедеятельности клетки, например для координации работы внутриклеточных ферментов и др. (см. курс биохимии). Наиболее сложная задача (сверхзадача) — изучить регуляцию взаимодействий между группами различных белков, так как один и тот же белок в зависимости от условий (которые трудно учесть или изменить *in vivo*) может вести себя совершенно по-разному. Для ее решения необходимы новые технологии изучения живых систем, например идентификация совокупностей белков методом МС с высокой пропускной способностью (high-throughput mass spectrometric protein complex identification, HMS-PCI) и новые достижения биоинформатики, например создание базы данных о межбелковом взаимодействии — Biomolecular Interaction Network Database (BIND).

Итак, протеомика — это одно из направлений молекулярной биологии, занимающееся сравнительным изучением клеточных протеомов.

Генные исследования и протеомика комплементарны в том смысле, что гены определяют образование специфических протеинов. Набор генов в любой клетке один и тот же, набор белков для каждой клетки индивидуален. Геном «сообщает», какие процессы могут теоретически протекать внутри данной клетки, а протеом, судя по имеющимся протеинам, «сообщает», что на самом деле происходит здесь и сейчас. Протеом постоянно меняется, ведь на состав белковых молекул влияют самые разные факторы. *Динамичная модификация белков — обязательный контрольный механизм в живых системах.* Различные эндогенные процессы, такие как фосфорилирование, ацетилирование, гликозилирование и убиквитилирование (конъюгация белка-мишени и белка убиквитина), регулируют многие функции, взаимодействия и превращения белков.

Повреждающие факторы могут влиять на модификационный статус белков несколькими путями (рис. 2-1). Некоторые токсиканты биотрансформируются в активные электрофилы, которые считаются причинами модификаций. Другие токсиканты могут привести к формированию оксидантов и эндогенных электрофилов, которые также модифицируют белки. Модификации эндогенных регуляторных белков весьма чувствительны к изменениям, вызванным факторами окружающей среды.

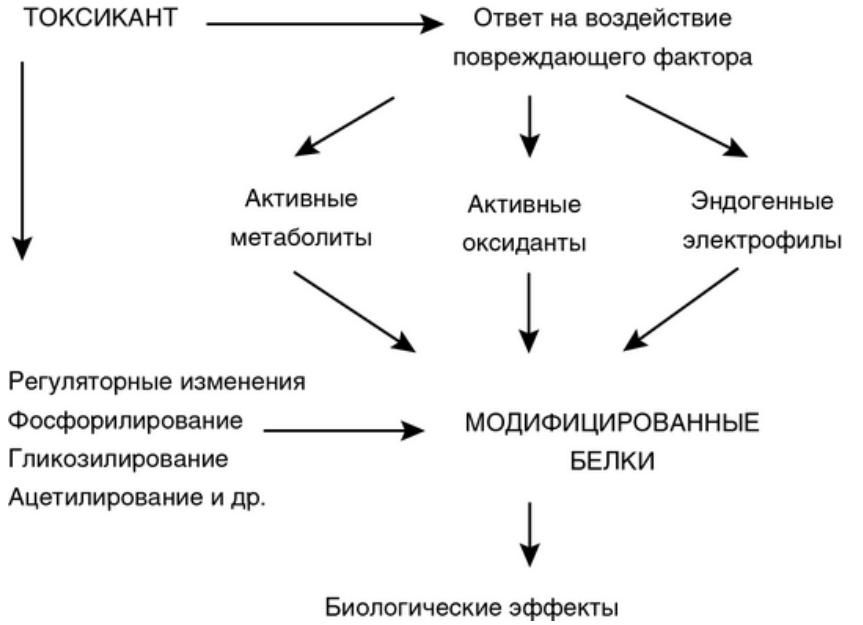


Рис. 2-1. Взаимосвязь между действием токсикантов и модификацией белков

Количество токсикантов и способов повреждения ими биологических систем возрастают по мере совершенствования организации последних.

Обычно выделяют следующие уровни организации биосистем: молекулярный и молекулярных систем, субклеточный, клеточный, органный, органно-тканевый, организменный, популяционный, биогеоценотический, биосферный. *Фундаментальные свойства биосистемы*: *метаболизм, пластический и энергетический обмен, регуляция и раздражимость, репродукция и изменчивость — взаимосвязаны.* Токсиканты могут оказывать повреждающее действие как на организм в целом, так и избирательно на отдельные фундаментальные свойства системы. *Чем выше токсичность ксенобиотика, тем значительнее выражена избирательность его действия.* Мишенью для воздействия токсиканта может быть любая молекула организма.

Молекулярные системы изменяют свои свойства под влиянием токсикантов. Например, система глутатиона, принимающая непосредственное участие в процессах, связанных с поддержанием внутриклеточного гомеостаза, при воздействии токсикантов выступает как биохимическая система естественной цитопротекции. В настоящее время установлена взаимосвязь между выраженностью цитотоксического действия ксенобиотиков (судорожных ядов, психотропных веществ, метгемоглобинобразователей, летучих ядов, алкилирующих агентов, цитостатиков и др.) и тяжестью повреждения системы глутатиона, изменением концентрации восстановленного глутатиона, сульфгидрильных групп белков, малонового диальдегида, диеновых конъюгатов, снижением активности глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, каталазы.

Молекулярные комплексы, цепи или сети, сформированные из молекулярных систем, участвуют в синтезе и организации более сложных субклеточных фрагментов, например ядра или митохондрий. Действие токсикантов иногда является избирательным, и токсиканты называют цитоплазматическими, лизосомными, мембранными и т.**д**. Функциональные или структурные нарушения в клетках ведут к развитию токсического повреждения во всем многоклеточном организме.

Различные органы имеют селективную чувствительность к определенным токсикантам, что связано с эволюционным развитием отдельных систем организма. Токсическое повреждение органа — это и нарушение целостности организма. Количество токсичных веществ, способных оказывать повреждающее действие на человека и высших животных, значительно больше, чем токсикантов, опасных для растений и примитивных одноклеточных и многоклеточных организмов, но *по мере усложнения биосистемы возрастают и ее адаптационные возможности.*

В многоклеточном организме взаимодействие между клетками происходит не только механически, но и коммуникационно. Разнообразие типов и подтипов *рецепторов* обеспечивает многочисленные физиологические ответы и передачу большого объема информации сигналпередающими путями. Основой

механизмов обмена информацией между клетками является различие в сродстве к лигандам у различных типов рецепторов (например, имея сходство более чем 50%, β~1~- и β~2~-адренорецепторы дифференцируют адреналин и норадреналин).

Рецепторы имеют один или несколько центров связывания сигнальных молекул и проявляют высокое сродство к своим лигандам. Любая клетка, ткань, орган содержит огромное количество потенциальных рецепторов различных типов, причем связывание лиганда (как эндогенного вещества, так и ксенобиотика) с рецептором данного типа является избирательным лишь в определенном диапазоне концентраций. *Увеличение концентрации лиганда в биосистеме приводит к расширению спектра рецепторов, с которыми он вступает во взаимодействие, и, следовательно, к изменению его биологической активности.*

Набор рецепторов, характерный для клетки, зависит от выполняемых ею функций. В одной только клеточной мембране могут находиться более десяти типов рецепторов. Связываясь с рецептором, внеклеточные химические посредники (сигнальные вещества) воздействуют на протекание в клетке-мишени физиологически важных процессов. В настоящее время описаны сотни рецепторов для гормонов, нейромедиаторов, простагландинов, вирусов, бактериальных токсинов, бактерий и простейших организмов. Например, клеточные образраспознающие рецепторы (*pattern recognition receptors — PRRs*), в частности Toll-рецепторы, быстро распознают и элиминируют бактерии, вирусы, некоторые виды грибов и простейших, а также могут распознавать ряд эндогенных активаторов врожденного иммунитета (БТШ, продукты некроза и апоптоза).

Рецепторами (см. гл. 1) могут являться молекулы или фрагменты белков, глико-, липо- или нуклеопротеинов и др. Для обозначения активного рецептора, инициирующего токсический процесс, используют термин *структура-мишень.*

Фрагмент биомолекулы (рецептора), который химически взаимодействует с лигандом, называют *рецепторной областью.* Например, рецептором оксида углерода(II) в организме является молекула гемоглобина, а рецепторной областью — ион железа(II) порфиринового кольца гема.

Для поддержания гомеостаза особое значение имеет взаимодействие эндогенных лигандов с *селективными рецепторами,* обладающими наивысшим сродством к отдельным биорегуляторам. Строение и свойства селективных рецепторов генетически кодируются.

К числу *постоянных селективных рецепторов* относятся рецепторы нейромедиаторов, гормонов, ферментов, транспортных протеинов.

Рецепторы *с изменяющейся структурой* формируются в клетках-предшественниках зрелых клеточных форм вследствие индуцированной внешними воздействиями рекомбинации двух-пяти генов, контролирующих их синтез. Как правило, это антитела и антигенсвязывающие рецепторы Т-лимфоцитов.

Структурный компонент биологической системы, взаимодействие которого с токсикантом не приводит к формированию ответной реакции, называют *немым рецептором.*

Токсиканты могут быть как *агонистами*, так и *антагонистами* эндогенных лигандов*,* в результате изменяется определенная биологическая функция, находящаяся под контролем селективных рецепторов. Токсиканты, взаимодействующие с ферментами и транспортерами, могут быть ингибиторами или аллостерическими регуляторами.

Структура и свойства комплексов взаимодействия рецепторов и лигандов зависят:

* от природы токсиканта (лиганда); * конформации рецептора; * содержания лиганда и количества активных рецепторов (структур-мишеней), вступивших во взаимодействие с токсикантом в биологической системе; * факторов среды (pH, ионной силы и т.д.).

Воздействие токсиканта выражено тем сильнее, чем большее количество активных рецепторов (структур-мишеней) вступило во взаимодействие с ним, а также чем большее значение имеют рецептор и повреждаемая биологическая система для поддержания гомеостаза организма.

Основные биологические функции клетки, как известно, реализуются посредством взаимодействия внеклеточного стимула (первичного мессенджера) с рецептором на поверхности клетки и передачи сигналов внутрь клетки.

Различают три больших класса *рецепторов клеточной поверхности:*

* рецепторы, содержащие один трансмембранный домен; * рецепторы, содержащие семь трансмембранных доменов; * рецепторы, содержащие четыре трансмембранных домена.

Последний класс рецепторов служит регулятором работы ионных каналов.

В мембранных рецепторах выделяют внеклеточный и внутриклеточный домены. На внеклеточном домене (гидрофильном участке рецептора, расположенном за пределами липидного бислоя) имеются места связывания с лигандами (рецепторная область).

В зависимости от *механизма передачи сигнала* рецепторы клеточной поверхности подразделяются на четыре класса:

* рецепторы, сопряженные с G-белками, активирующими или ингибирующими специфические вторичные посредники (через G-белки также осуществляется регуляция ионных каналов); * рецепторы, формирующие только ионные каналы; * рецепторы с тирозинкиназной активностью (рецепторы, ассоциированные с цитозольными тирозиновыми протеинкиназами); * рецепторы, образующие межрецепторные сети.

Рецепторы, сопряженные с G-белками. В системе клеточной сигнализации существуют эффекторные молекулы, которые запускают образование вторичных посредников (вторичных мессенджеров). Рецепторы, сопряженные с *G*-белком*G*-белки — это семейство гуанин-нуклеотидсвязывающих белков, передающих сигнал с мембранных рецепторов на определенные эффекторные молекулы в клетке. 80% первичных мессенджеров взаимодействует с рецепторами, которые связаны с эффекторами через G-белки., передают сигнал таким эффекторным молекулам, как аденилатциклаза (*AC*), фосфолипаза *C* (*PLC*), фосфолипаза *A*2 (*PLA*2), *cGMP*-специфическая фосфодиэстераза фоторецепторов, и нескольким типам ионных каналовИзвестно два основных механизма, с помощью которых рецепторы клеточной поверхности, сопряженные с *G*-белками, запускают образование вторичных посредников. Один механизм связан с тем, что *G*-белок активирует фермент аденилатциклазу, который синтезирует *cAMP* (цАМФ, циклический аденозин-3',5'-монофосфат). В другом случае *G*-белок активирует фермент фосфолипазу *C* (*PLC*), гидролизующую мембранный фосфолипид *PIP*2 (фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат) на два вторичных медиатора — *IP*~3~ (инозитолтрифосфат) и *DAG* (диацилглицерин), которые модулируют кальциевые каналы эндоплазматического ретикулума, в результате чего высвобождаются ионы Ca^2+^. В обоих вариантах связывание внеклеточного лиганда изменяет конформацию цитоплазматического домена рецептора, такое изменение передается на *G*-белок и активирует его. Активированный *G*-белок взаимодействует с определенными ферментами плазматической мембраны..

Рецепторы, связанные с *G*-белками, представляют собой трансмембранные белки, имеющие семь трансмембранных доменов, внеклеточный N-конец и внутриклеточный С-конец. Сайт связывания с лигандом находится на внеклеточных петлях. К рецепторам, связанным с *G*-белками, относят мускаринчувствительные холинергические рецепторы (М-холинорецепторы, по зарубежной терминологии — холиноцепторы), α- и β-адренорецепторы (адреноцепторы), дофаминергические, серотонинергические, гистаминергические рецепторы, а также ряд близких рецепторных структур, различающихся незначительными особенностями связывания с липидной мембраной, третичной структуры и/или конформацией.

Стимулирующие *G*-белки активируют в ходе передачи сигнала аденилатциклазу клеток-эффекторов, а ингибиторные *G*-белки этот фермент угнетают.

Совокупность взаимодействующих между собой макромолекул, осуществляющих передачу сигналов по пути, опосредованному *G*-белками, называют *системой сигнальной трансдукции* (ССТ). Перечень вторичных мессенджеров включает цАМФ, цГМФ (циклический гуанозин-3',5'-монофосфат), фосфоинозитиды, ионы Ca^2+^, протон, метаболиты арахидоновой и ретиноевой кислот, оксид азота (II) NO, другие химические соединения биогенного происхождения. Результатом действия внутриклеточных посредников передачи сигналов является

фосфорилирование белков, активация их ионами Ca^2+^ или другими факторами, что приводит к ответу на клеточном уровне: секреции, сокращению, индукции различных генов, пролиферации и др.

ССТ обрабатывает и внеклеточные сигналы различной химической природы или световые воздействия. Алгоритм действия ССТ постоянен, а результирующие ответы клеток весьма разнообразны.

С рецепторами данного типа избирательно взаимодействует большое количество веществ, например наркотические средства, обладающие психодислептической активностью [диэтиламид лизергиновой кислоты (ЛСД), псилоцин, псилоцибин, буфотенин, мескалин, хинуклидинилбензилат [*BZ]* и др., см. гл. 6], лекарственные препараты, действующие на холинэргические, катехоламинергические, серотонинергические синапсы (см. гл. 6), интоксикация которыми развивается как при перевозбуждении, так и при блокаде рецепторов.

Рецепторы, формирующие ионные каналы, участвуют в передаче нервных импульсов в ЦНС и на периферии. Наиболее известные каналообразующие рецепторы — это никотинчувствительный рецептор АХ (Н-холиноцептор) для ионов Na^+^, ГАМКергический и глицинергический рецепторы для ионов Cl^ — ^. Пример агониста Н-холинорецепторов — алкалоид никотин; агониста ГАМК-рецепторов — содержащийся в рыбной ягоде (лат. *Anamírta cócculus)* сесквитерпеноид пикротоксинин, который иногда используют в качестве противоядия при отравлении барбитуратами; агониста рецепторов к глицину — алкалоид стрихнин (см. гл. 6).

Каналообразующие рецепторы состоят из нескольких субъединиц. Одни субъединицы образуют рецепторную область, другие после взаимодействия рецепторной области с лигандом изменяют свою конформацию и участвуют в формировании ионного канала. Например, холинергический рецептор никотинового типа имеет гликозилированные с внешней стороны субъединицы (полипептидные цепи которых 4 раза пронизывают липидный бислой мембраны), а внутри взаимодействующие с белками тубулинового и актинового скелета. Связывание АХ с двумя α-субъединицами рецептора вызывает конформационные изменения в олигомерном комплексе, в результате чего ионы Na^+^ входят в клетку. Ионные натриевые, калиевые и кальциевые каналы возбудимых мембран имеют рецепторную область связывания высокотоксичных ядов животного происхождения, таких как тетродотоксин, сакситоксин, батрахотоксин (см. гл. 10).

Сигнальные молекулы (*первичные мессенджеры*) также могут проникать через плазмалемму путем изменения ионных каналов.

Рецепторы с тирозинкиназной активностью (рецепторы, ассоциированные с цитозольными тирозиновыми протеинкиназами). Рецепторные протеинкиназы фосфорилируют белки по тирозиновым остаткам, поэтому их называют тирозинкиназными рецепторами (*RTK*). Они играют ведущую роль в процессах роста, развития и дифференцировки клеток. Лигандами рецепторов этого типа являются факторы роста (*GF*, митогены) — полипептиды, состоящие из 50–100 аминокислот. Каждый тип *GF* связывается с внеклеточным доменом собственного специфического рецептора и, наоборот, не связывается с рецепторами для других факторов роста. Например, эпидермальный фактор роста (*EGF*) может связаться на поверхности клеток только с *EGF*-рецептором, но не с рецептором к фактору роста тромбоцитов, который может также находиться на поверхности тех же клеток. В настоящее время выделяют 14 различных семейств тирозикиназных рецепторов. Различие между семействами в основном проявляется в структуре их экстраклеточных доменов.

RTK состоит из четырех основных доменов. Экстраклеточный лиганд-связывающий N-концевой домен участвует в получении внешнего сигнала и связывании лиганда (например, фактора роста *GF*), которое изменяет конформацию рецептора. Экстраклеточный домен соединен одиночным трансмембранным доменом со специализированным С-концевым доменом — ферментом в цитоплазме. Трансмембранный домен, являющийся гомодимером, субъединицы которого связаны дисульфидным мостиком, однократно пронизывает мембрану и соединяет вне- и внутриклеточные домены. Конформационные изменения рецептора активируют цитоплазматический тирозинкиназный домен (290 аминокислот), который определяет биологический ответ. Различные рецепторы содержат один или более регуляторных доменов, на которых расположены участки аутофосфорилирования множества близлежащих цитоплазматических субстратных белков, которые затем передают сигнал далее в клетку. После связывания лиганда многие рецепторы путем эндоцитоза (см. гл. 3)

погружаются внутрь клетки. К рецепторам данного типа также относятся рецепторы к инсулину. Избирательно действующие токсиканты неизвестны.

Рецепторы, образующие межрецепторные сети. Существует группа рецепторов с молекулярной массой около 30 000–50 000 Д, образующих межрецепторные сети на поверхности клеток. Связывание таких рецепторов с лигандом не вызывает непосредственной передачи сигнала на эффекторные молекулы. Пример — рецепторы к *Fc*-фрагменту (fragment crystalline) антител (иммуноглобулинов). Образование межрецепторных сетей *IgE-Fc*-рецепторов происходит при связывании антигена с молекулами фиксированных на мембранах тучных клеток антител, что приводит к выбросу гистамина из тучных клеток и возникновению анафилактических реакций.

Гормоны (например, стероидные и тиреоидные гормоны) взаимодействуют не только с основными типами рецепторов клеточной поверхности, но и с растворимыми *внутриклеточными рецепторами*.

В 80-х годах XX в. была сформулирована *новая модель рецепции стероидных гормонов,* включающая следующие положения:

* рецепторы вне зависимости от присутствия гормона-лиганда локализованы преимущественно в клеточном ядре; * распределение рецепторов между ядром и цитоплазмой представляет собой равновесный процесс со значительным сдвигом равновесия в сторону ядерной фракции; * прочность связывания рецепторов с ядерными структурами увеличивается в присутствии гормона-лиганда в результате образования гормон-рецепторных комплексов.

Все гормональные рецепторы являются белками, способными *нековалентно* связывать гормон, и делятся на две группы в зависимости от природы связываемого гормона. *Липофильные гормоны* (например, стероиды) легко проходят через клеточную мембрану, связываются с рецептором и приобретают дополнительное сродство к ядерным акцепторным структурам. *Гидрофильные гормоны*, не способные проникать через клеточную мембрану, связываются с рецепторами на ее поверхности, что обеспечивает запуск передачи сигнала внутрь клетки.

Независимо от локализации, рецепторы гормонов имеют ряд общих характеристик:

* рецепторы обладают высоким сродством к соответствующему гормону, поэтому связывание происходит при довольно низкой его концентрации; * рецепторы имеют высокую степень структурной специфичности, и рецептор определенного гормона будет связывать только этот гормон или близкородственное соединение; * рецепторы обладают тканевой специфичностью.

Таким образом, тканевая и структурная специфичность рецепторов обеспечивает действие гормона только в своей ткани-мишени.

Отдельной областью внутриклеточной сигнализации можно считать *кальциевую систему сигнализации*. Для нормального функционирования клетки необходимо поддержание низкой концентрации ионов Ca^2+^ (в диапазоне 10^–6^—10^–7^ М), так как длительное повышение уровня кальция в цитозоле приводит к гибели клетки (см. п. 2.2).

2.2. Механизмы токсического действия и межклеточной коммуникации

Познание не может опираться только на
факты. Для восхождения по пути познания
необходимо также и умозрение.

Николай Иванович Пирогов (1810–1881),
выдающийся русский хирург, профессор,
основатель русской военно-полевой хирургии

Из-за огромного числа потенциальных токсикантов и множества биологических структур и процессов, которые они могут нарушать, существует большое количество путей реализации токсического действия. Обычно токсикант, доставленный к мишени, реагирует с ней, вызывая клеточную дисфункцию. Иногда ксенобиотики не реагируют

с конкретной мишенью, а неблагоприятно влияют на все биологическое окружение, вызывая дисфункции органелл, клеток или органов.

Схема токсического процесса включает несколько этапов (рис. 2-2). Сначала токсикант доставляется к цели или целям (этап 1) и взаимодействует с эндогенными молекулами-мишенями (этап 2а), вызывая изменения функций клетки и/ или структур (этап 3), которые запускают восстановительные механизмы на молекулярном, клеточном, и/ или тканевом уровнях. Сила воздействия токсиканта может превышать способности механизмов репарации или вызывать «неправильное срабатывание» этих процессов (этап 4). В этом случае развиваются следующие процессы:

* некроз тканей; * канцерогенез; * фиброз; * нарушение регуляции апоптоза.

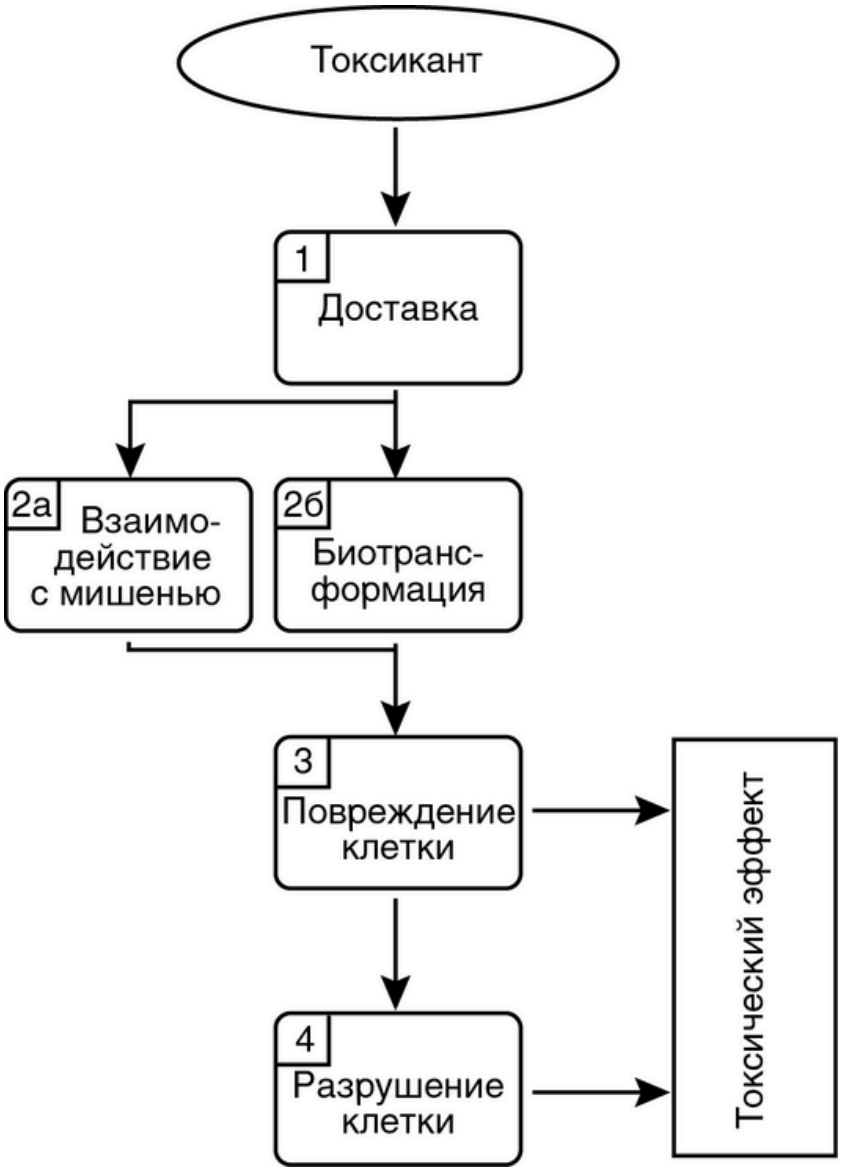


Рис. 2-2. Этапы развития токсического эффекта после химического воздействия

Этап 1 — доставка токсиканта от места воздействия к мишени

Интенсивность токсического эффекта зависит от концентрации и времени нахождения конечного токсиканта вблизи мишени.

Конечный токсикант — это вещество, которое реагирует с эндогенной молекулой-мишенью или повреждает биологическое окружение, инициируя структурные и/ или функциональные нарушения.

Конечным токсикантом могут быть как исходное соединение, так и его метаболиты (см. гл. 3), а также активные формы кислорода (АФК), генерированные при биотрансформации токсиканта или эндогенной молекулы.

Концентрация конечного токсиканта в мишени зависит от относительной эффективности процессов, сопровождающих его транспорт, который облегчается процессами абсорбции, диффузии, реабсорбции, токсикации и тормозится процессами пресистемной элиминации, обратной диффузии, экскреции и детоксикации (см. гл. 3).

Токсикация, или **метаболическая активация,** — это биотрансформация токсикантов в более ядовитые продукты (подробно см. гл. 3). Иногда в результате биотрансформации вещества приобретают реактивность и структурные признаки, позволяющие более эффективно взаимодействовать со специфическими рецепторами или ферментами. Однако значительно чаще токсикация изменяет эндо- и ксенобиотики так, что они приобретают способность взаимодействовать с функциональными группами молекул различных эндогенных соединений и превращать их в электрофилы, свободные радикалы (супероксид-анион радикал O~2~^•^⁻, гидроксидный радикал HO^•^, гидропероксидный радикал HOO^•^), нуклеофилы, редокс-активные частицы.

Детоксикация — это биотрансформация, в ходе которой обезвреживается основной токсикант или предотвращается его образование. В ряде случаев детоксикация может конкурировать с токсикацией. Детоксикация ксенобиотиков, не содержащих функциональные группы, как правило, происходит в две фазы. Сначала в молекулу внедряется функциональная группа, например гидроксидная или карбоксильная (фаза I), а затем к этой группе с помощью ферментов присоединяется эндогенная кислота, например глюкуроновая, серная или аминокислота (фаза II). За некоторыми исключениями конечные продукты неактивны, высокогидрофильны и легко экскретируются (см. гл. 3).

Детоксикация токсикантов-нуклеофилов в большинстве случаев осуществляется путем конъюгации по нуклеофильным функциональным группам (фаза II биотрансформации).

Детоксикация токсикантов-электрофилов обычно включает в себя конъюгацию с нуклеофилом глутатионом (фаза II биотрансформации). Эта реакция может идти спонтанно или индуцироваться глутатион-S-трансферазой.

Детоксикация свободных радикалов — это прежде всего элиминация супероксид-анион радикала O~2~^•^⁻, так как он может превращаться в гораздо более активные частицы.

Известно *два пути токсического действия* супероксид-анион-радикала O~2~^•^⁻:

* через нерадикальные продукты ($ONOO^-$ и H~2~O~2~); * через радикалы (^•^NO~2~, $CO~3~^{•}^{-}$ и HO^•^).

Превращение O~2~^•^⁻ в H~2~O~2~ идет спонтанно или катализируется супероксиддисмутазой (SOD, СОД). Распад пероксида водорода до гидроксильного радикала HO^• ^и гидроксид-иона OH^- называется реакцией Фентона и катализируется ионами металлов. Образование гидроксильного радикала обусловливает чрезвычайно высокую токсичность ксенобиотиков, генерирующих O~2~^•^⁻.

В другом случае O~2~^•^⁻ бурно реагирует с оксидом азота NOB структуре молекулы NO имеется один неспаренный электрон., который синтезируется в организме из аминокислоты аргинина NO-синтазой (*NOS*), образуя пероксинитрит ($ONOO^-$). Спонтанная реакция пероксинитрит-иона с оксидом углерода(IV) приводит к образованию нитрозопероксикарбоната (ONOOCO~2~⁻), который гомолитически распадается до ^•^NO~2~ — радикала оксида азота(IV) и карбонат-анион-радикала $CO~3~^{•}^{-}$. Три продукта ($CO~3~^{•}^{-}$, HO^•^, HO^-) являются окислителями, ^•^NO~2~ — еще и нитрующий агент.

Ферментов, элиминирующих HO^•^, не существует; единственной эффективной защитой является предотвращение образования HO^• ^путем трансформации его предшественника пероксида водорода в воду. Супероксиддисмутазы, содержащиеся в цитозоле (Cu-*SOD*, Zn-*SOD*) и митохондриях (Mn-*SOD*), превращают O~2~^•^⁻ в H~2~O~2~, который затем восстанавливается до воды цитозольной глутатионпероксидазой или пероксисомной каталазой.

Пероксинитрит-ион ($ONOO^-$) не является свободнорадикальным окислителем и более стабилен, чем HO^•^. Глутатионпероксидаза способна восстанавливать $ONOO^-$ до нитрита (ONO^-). Кроме того, $ONOO^-$ реагирует с оксигемоглобином, гемсодержащими пероксидазами и альбумином. Эти реакции важны для элиминации $ONOO^-$. Предотвращение синтеза $ONOO^-$ возможно путем удаления двух его предшественников (прекурсоров): NO — за счет его взаимодействия с гемоглобиномNO — универсальный эндогенный регулятор ключевых биохимических процессов, который может влиять на клеточный метаболизм без участия вторичных мессенджеров. Одно из важных

свойств NO — способность с высоким сродством взаимодействовать с железом клеточных металлопротеинов. При связывании с гемом между NO и Fe(II) образуется ковалентная, более прочная химическая связь, чем в комплексах гема с O~2~, в которых формируются слабые ион-дипольные взаимодействия. При этом неспаренный электрон молекулы NO переходит на *d*-орбиталь железа, образуя конфигурацию *d*^7^, а сама молекула NO приобретает положительный заряд; существенно меняется не только эффективная геометрия комплексов, но и заселенность *p*-орбиталей атомов углерода и азота порфиринового кольца, что должно влиять на реакционную способность комплекса (Романова Т. А. и др.). и O~2~^•^⁻ — за счет взаимодействия с супероксиддисмутазой.

Пероксидазогенерированные свободные радикалы разрушаются путем переноса электронов с глутатиона. Это сопровождается окислением глутатиона, который регенерируется NADPH-зависимой глутатионредуктазой. Таким образом, глутатион играет важную роль в детоксикации и электрофилов, и свободных радикалов.

В детоксикации природных токсинов — ядов животного и растительного происхождения (см. гл. 10) участвуют вне- и внутриклеточные протеазы. Например, при действии фосфолипазы происходит восстановление дисульфидной группы эрабутоксина и теряется его активность.

Если токсикант инактивирует детоксицирующие ферменты, то детоксикация неэффективна, образуются его токсичные метаболиты, активно идет процесс токсикации.

Этап 2 — взаимодействие конечного токсиканта с молекулой-мишенью

Обычно токсичность обусловлена реакцией конечного токсиканта с молекулой-мишенью (см. рис. 2-2, этап 2а). Фактически все эндогенные соединения — потенциальные цели для токсикантов. Наиболее распространенные и токсикологически значимые цели — мембраны клеток, внутриклеточные структуры, нуклеиновые кислоты (особенно ДНК), белки и часто ферменты, участвующие в синтезе активных метаболитов токсикантов.

Конечный токсикант может связываться с молекулами-мишенями ковалентно и нековалентно. *Нековалентное связывание* — образование водородных, ионных и других связей — типично для токсикантов, взаимодействующих с мембранными и внутриклеточными рецепторами, ионными каналами и некоторыми ферментами. Оно обычно обратимо из-за сравнительно низкой энергии связи. Нековалентное связывание с белками клетки, не вызывающее нарушения ее функций, может быть видом детоксикации, оберегающим токсикологически значимые цели (см. гл. 3).

Необратимое ковалентное связывание полностью повреждает эндогенные молекулы. Образование ковалентного аддукта характерно для электрофильных токсикантов, реагирующих с нуклеофильными центрами в биологических макромолекулах (белках и нуклеиновых кислотах). Свободные радикалы типа HO^•^, NO~2~^•^ и C1~3~C^•^ могут ковалентно связываться с макромолекулами или отщеплять атомы водорода от эндогенных соединений, превращая их в радикалы.

Ковалентное связывание токсикантов или их метаболитов с белками может приводить к образованию антигенов и развитию иммунного ответа.

Некоторые токсиканты активируют молекулы-мишени, однако чаще ингибируют их функции, блокируя рецепторы, ионные каналы или ферменты. Функция белка нарушается при изменении его конформации, которая, в свою очередь, существенно меняется при взаимодействии с токсикантом. Многие белки содержат субъединицы, обеспечивающие их активность или способность соединяться в макромолекулярные комплексы. Ковалентное связывание и/ или окисление таких субъединиц ксенобиотиками может привести к нарушениям передачи сигнала, энергетического обеспечения клеток и метаболического гомеостаза. Некоторые химические агенты (динитрохлорбензол, пенициллин, соединения никеля) могут спонтанно связываться с белками, другие могут приобрести такую способность вследствие аутоокисления или энзиматической биотрансформации (см. гл. 3).

Действие большинства конечных токсикантов на эндогенные молекулы зависит от их реакционной способности, а пути превращения могут значительно различаться.

Токсиканты могут нарушать матричную функцию ДНК. Ковалентное связывание химических агентов с ДНК (образование аддуктов) вызывает ошибки при репликации. Кроме образования аддуктов, токсиканты изменяют

первичную структуру эндогенных молекул поперечным сшиванием или фрагментацией. Сшивки меняют пространственную подвижность и функциональность молекул.

Молекулы-мишени после химической атаки часто подвергаются спонтанной деградации. Свободные радикалы типа Cl~3~COO^•^ и HO^•^ могут инициировать пероксидное разрушение липидов. Это приводит к деградации липидов в клеточных мембранах и образованию свободных радикалов жирных кислот и электрофилов, нарушающих структуру ДНК.

Некоторые ксенобиотики вызывают токсическую реакцию, не воздействуя на молекулы-мишени, а изменяя pH среды, нарушая структуру клеточных мембран и приводя к исчезновению разности ионных концентраций или конкурируя с эндогенными молекулами за физиологически важное пространство.

Этап 3 — клеточная дисфункция

Взаимодействие с молекулой-мишенью может приводить к нарушению функций клетки. Каждая клетка в многоклеточном организме участвует в определенных процессах, контролируемых соответствующими системами. Одни программы обеспечивают клеточное деление, дифференцировку и апоптоз, другие управляют функциональной деятельностью дифференцированных клеток. Регулирование работы клетки осуществляется с помощью СТС, которая может быть активирована или инактивирована внешними сигнальными молекулами.

Первичная клеточная дисфункция, вызванная токсикантом, — не обязательно окончательный результат, все зависит от функции молекулы-мишени. Если молекула-мишень участвует в клеточной регуляции (передаче сигналов), то прежде всего происходит дисрегуляция экспрессии генов и/ или дисрегуляция выполняемой клеткой функции. Однако если молекула-мишень вовлечена в процессы клеточного жизнеобеспечения, ее повреждение может привести к гибели клетки. Воздействие токсиканта на внутриклеточные структуры, обеспечивающие выполнение внешних функций клетки, может изменить активность других клеток.

Нарушение регуляции клеточных функций. Деятельность клеток регулируется сигнальными молекулами, которые активируют определенные клеточные рецепторы, передающие сигнал регуляторным областям генов и/ или функциональным белкам. Активация рецептора может привести к изменению экспрессии гена и/ или химической модификации определенных белков (обычно путем фосфорилирования). Программы, управляющие жизнью клеток, прежде всего затрагивают экспрессию генов. Программы, контролирующие функции клеток, влияют на деятельность функциональных белков; однако один сигнал часто вызывает оба ответа из-за переходов и взаимосвязи сетей передачи сигналов.

Дисрегуляция генной экспрессии происходит при воздействии на структуры, принимающие участие в транскрипции, передаче сигналов, синтезе, хранении или выделении экстрацеллюлярных сигнальных веществ.

Нарушение регуляции транскрипции. Транскрипция, представляющая собой передачу генетической информации от ДНК к мРНК, управляется взаимодействием *факторов транскрипции* (*TFs*) и промоторных участков гена. Токсиканты могут нарушать этот процесс. Обычно повреждаются те *TFs*, в связывании и активации которых участвуют природные соединения, например гормоны и витамины. Биогенный или чужеродный лиганд может оказывать токсический эффект в двух случаях — при воздействии в больших дозах и/ или в определенные периоды онтогенеза. Другие вещества, взаимодействующие с *TFs*, могут нарушать дифференцировку клеток за счет усиления экспрессии различных генов.

Нарушение процессов передачи сигнала. Экстрацеллюлярные сигнальные молекулы (факторы роста, цитокины, гормоны и нейротрансмиттеры) могут в конечном счете активировать *TFs*, воздействуя на мембранные рецепторы и/ или внутриклеточную систему передачи сигнала. Примером может служить кодируемый *c-myc* протоонкогеном *c-Myc*-белок — *TFs*, который способен как активировать, так и репрессировать транскрипцию генов. *c-Myc*-белок после димеризации с *Max*-белком и связывания комплекса с определенной нуклеотидной последовательностью активирует гены циклинов *D* и *E*. Последние в свою очередь ускоряют деление клетки, активируя циклинзависимые киназы. Синтезированные при этом сигнальные молекулы ускоряют клеточную пролиферацию. Сигнал от мембранных рецепторов до *TFs* передается последовательным взаимодействием белок–белок и изменением конформации белка при фосфорилировании, т. е. сигнальная молекула вызывает фосфорилирование белка,

например *митогенактивируемой киназы* (*MARK*), которая, в свою очередь, фосфорилирует и активирует другой белок. Лиганды к мембранным рецепторам фактора роста запускают процесс аутофосфорилирования этих рецепторов. Затем уже фосфорилированные рецепторы передают сигнал на *Ras* (*G*-белок). Активный *Ras* инициирует каскад *MARK*, запуская последовательное фосфорилирование белков киназами и передавая сигнал на *TFs*. Передаточные молекулы обычно, но не всегда активируются фосфорилированием (катализируется киназами) и инактивируются дефосфорилированием (катализируется фосфатазами). Химические агенты могут нарушать (прекращать или извращать) передачу сигнала путем повреждения структур, участвующих в фосфорилировании (например, *G*-белков), и в конечном счете влиять на клеточный цикл.

Сигнал от рецепторов *EGF*, действующих на тирозинкиназные рецепторы, передается на промежуточные белки — *Shc*, *Grb2, SOS*. Эти белки превращают ГДФ-связанный *Ras* (*G*-белок, неактивный) в активную ГТФ-форму. Последняя активирует *MAR*-киназный каскад (*Raf, MARKK, MARK*). Он состоит из трех протеинкиназ. *Протеинкиназы* — это ферменты, способные катализировать реакцию присоединения фосфата к остатку серина, треонина или тирозина в молекуле белка, образуя фосфорилированную форму этой молекулы. При этом конформация молекулы меняется: белок активируется или ингибируется. Фосфорилирование — один из главных способов регуляции внутриклеточных процессов, и в первую очередь регуляции процессов считывания генетической информации (по разным оценкам, существует от 2000 до 10 000 разных протеинкиназ). Последняя стадия *MAR*-каскада — образование активной киназы, называемой *MAR-киназой* (*MARK*). Этот фермент фосфорилирует и тем самым меняет активность нескольких белков-мишеней. *MARK* становится активной киназой только после того, как к ней будет присоединен фосфат. Для того чтобы активировать *MARK*, в клетке существует другая (*специализированная*) киназа, которая умеет фосфорилировать только *MARK* — это *киназа MARK (MARKK*). Исходно этот фермент неактивен, как и *MARK*, и в свою очередь тоже активируется присоединением фосфата. Для этого в клетке существует еще одна протеинкиназа — *Raf* (киназа киназы *MAR*-киназы). Она исходно тоже неактивна, но ее активирует *Ras*, получивший извне сигнал, проходящий через цепочку внутриклеточной сигнализации, связанную с вторичными мессенджерами.

Фосфорилированная *MARK* переходит в ядро и фосфорилирует *TFs*, позволяя им связаться со специфическими последовательностями промотора.

Все сигнальные системы взаимосвязаны. Для передачи митогенного сигнала от рецепторов используется тот же путь передачи: рецептор *EGF* → *MARK*. Митогенный сигнал, переданный через рецептор *EGF* на *MARK*, может быть усилен, например, *Raf*-катализируемым фосфорилированием белка *IkB*, который отщепляет от ингибирующего белка *транскрипционный фактор NF-kB*. *NF-kB* может активироваться, например, АФК, введением в клетку фенобарбитала или пролифераторов пероксисом. Активация происходит опосредованно через *Ras-Raf-MARKK-MARK* сигнальный путь.

Рецептор *трансформирующего ростового фактора β* (*TGF*-β) активирует путем фосфорилирования цитоплазматические медиаторы — белки *Smad*. Это группа родственных внутриклеточных белков, передающих сигнал в ядро от сверхсемейства *TGF*-β. *Smad* блокирует клеточный цикл, прерывая путь передачи сигнала. Усилить митогенный сигнал можно *MARK*-катализируемым фосфорилированием *Smad*.

Митогенный сигнал появляется также при активации протеинкиназ (*PKC, CaMK, MARK*) ионами кальция. Некоторые ксенобиотики способны блокировать проведение сигнала. Часть из них может стимулировать пролиферацию (активация митогенных протеинкиназ, например *PKC,* инактивация фосфатаз *PTP, PP2A*, инактивация *GAP, IkB*). Другая часть, например ингибиторы *PKC*, препятствуют митозу и вызывают апоптоз.

Представленная схема передачи сигналов очень упрощенная. Фактически все компоненты системы передачи сигналов (например, *G*-белки*, PKC, MARK*) присутствуют в многочисленных, функционально различных формах, характерных только для определенных клеток. Системы, участвующие в регуляции экспрессии генов, не только определяют жизненный цикл клеток, но и управляют некоторыми процессами клеточной деятельности. Например, *NF-kB* стимулирует синтез *белков теплового шока* (*БТШ, HSP*).

Химически нарушенная передача сигнала с пролиферативным эффектом. Ксенобиотики, облегчающие фосфорилирование фрагментов цепи передачи сигнала, часто провоцируют усиление клеточного деления

и формирование опухоли. Эфиры форбола и фумонизин *B* активируют протеинкиназу *C* (ПКС, *PKC*), подражая диацилглицеролу (ДАГ, *DAG*) — одному из физиологических активаторов *PKC*. *И*оны двухвалентного свинца имитируют действие другого физиологического активатора *PKC* — Ca^2+^. Активированная *PKC* передает сигнал далее, запуская киназный каскад и в конце концов позволяя *TFs* связаться с участками ДНК. Протеинкиназы могут активироваться и поврежденными белками.

Усиление фосфорилирования белков является результатом сниженной активности фосфатаз. *Ингибирование фосфатаз — основной механизм действия ряда химических агентов.* Оно происходит и при УФ-облучении. Растворимая фосфатаза 2А (*PP2A*) отвечает за инактивацию *MARK*. *PP2A* дефосфорилирует инициирующую митоз протеинкиназу. Существуют и другие ингибирующие ферменты. Так, ингибиторный белок *IkB*, гомологичный структурному белку анкирину, связывается с *NF-κB* и предотвращает его проникновение в ядро (блокирование функции *TFs*).

Среди транскрипционных регуляторных белков *NF-kB* (*NF-kappaB*) является уникальным. Он играет роль внутриклеточного медиатора большого количества внешних воздействий в некоторых типах клеток. Уникальность этого цитоплазматического фактора транскрипции состоит в наличии большого числа внутриклеточных путей его активации (воспалительными цитокинами, окисленными липидами, факторами, присутствующими в атероматозных бляшках) и его способности быстро активировать множество генов. *NF-kB* — важный интегрирующий инструмент клетки. Комбинаторное использование его разных субъединиц приводит к возможности дифференциальной регуляции множества генов с различными функциями в разных типах клеток в разное время. Все эти белки работают в клетке как ДНК-связывающие транскрипционные факторы. *MARK* могут регулировать транскрипцию, фосфорилируя ингибиторы *TFs*. В случае *NF-kB* как раз и осуществляется подобная регуляция. *NF-kB* находится в цитоплазме в виде комплекса с одним из членов семейства ингибиторных белков *I-kB* и удерживается там этим ингибитором за счет белок-белковых взаимодействий. Роль ингибитора состоит в том, что он маскирует сигнал ядерной локализации фактора. *И*нгибитор фосфорилирован, но при получении сигнала он фосфорилируется интенсивнее и затем деградирует. Неизвестно, какие именно из киназ осуществляют фосфорилирование в ответ на внеклеточные сигналы. Положение осложняется тем, что есть несколько родственных ингибиторов и, возможно, разные ингибиторы фосфорилируются разными киназами. Но как бы там ни было, фактор *NF-kB* освобождается и направляется в ядро, где взаимодействует со специфическими последовательностями в регуляторных участках генов и активирует транскрипцию определенных групп генов.

NF-kB, являясь важным *TFs*, контролируют широкий спектр клеточной активности (пролиферацию, взаимодействие клеток при развитии иммунного ответа, процессы воспаления и т.д.).

IkB-деградация и *NF-κB*-активация также могут быть вызваны кислородным голоданием.

Химически нарушенная передача сигнала с антипролиферативным эффектом. Падение интенсивности сигнала пролиферации (последовательность: ингибирование *Raf* белков → уменьшение деградации *IkB* → угнетение процесса связывания *NF-kB* с ДНК → снижение интенсивности синтеза белка *c-Myc* мРНК), возникающее после повреждения клеток, ставит под угрозу процесс регенерации. Нарушение регуляции митогенного сигнала — путь к апоптозу.

Нарушение регуляции синтеза внеклеточных сигнальных веществ. Гормоны передней доли гипофиза активируют деление и пролиферацию клеток в эндокринных железах. Снижение уровня секреции гормонов гипофиза под действием токсикантов приводит к развитию дегенеративных процессов в периферических железах и апоптозу.

Нарушение регуляции клеточной активности. Токсиканты могут изменять функции специализированных клеток путем нарушения любого этапа передачи сигнала.

Нарушение регуляции процессов передачи сигналов в электрически активных клетках. Многие ксенобиотики влияют на деятельность нейронов, клеток скелетной и сердечной мускулатуры. Средством передачи информации от нейрона к другим клеткам: другому нейрону, мышечной клетке, клетке железы или другим видам клеток — служат *нейротрансмиттеры (нейромедиаторы).* Содержание информации, передаваемой нейротрансмиттером, различно. Это может быть управляющая информация, информация о состоянии объекта управления, информация

о результатах управления. Все виды информации необходимы для структурно-функциональной организации элементов субклеточных систем, клеток, тканей, органов, систем органов.

Влияние токсикантов может проявляться:

* изменением концентрации нейротрансмиттеров в синаптической щели; * нарушением функции рецепторов; * повреждением процессов внутриклеточной передачи сигналов; * изменением содержания нейротрансмиттеров в синапсах из-за нарушения процессов их синтеза, хранения, элиминации и экскреции; * агонистическим (имитирующим действие нейротрансмиттера) действием на рецепторы; * антагонистическим (имитирующим действие антагониста) действием на рецепторы; * активирующим действием на рецепторы; * ингибирующим действием на рецепторы.

Последние два вида воздействия осуществляются на участках рецептора, удаленных от зоны связывания с лигандом.

Некоторые токсиканты способны активировать (инактивировать) потенциалзависимые натриевые каналы. Сигнал в клетке формируется за счет изменения тока катионов; удаление их посредством ионных каналов или транспортеров приводит к терминации сигнала. Ингибирование ионных каналов и транспортеров может продлевать эффекты веществ. Токсиканты могут нарушать процесс терминации сигнала.

Многие изученные механизмы регуляции реализуются и в слабовозбудимых клетках (экзокринных железах, клетках Купера, β-клетках поджелудочной железы). Повреждение механизмов регуляции в таких клетках мало влияет на функции органов.

Повреждение процессов внутриклеточного жизнеобеспечения: механизмы токсической клеточной смерти

Для выживания все клетки должны синтезировать эндогенные молекулы, собирать макромолекулярные комплексы, мембраны и клеточные органеллы, поддерживать постоянство внутренней среды, производить энергию. Агенты, повреждающие эти процессы, ставят под угрозу жизнь клетки. Существует три механизма инициирования клеточной смерти:

* истощение запасов АТФ; * устойчивое повышение концентрации ионов кальция; * избыточная продукция АФК (ROS).

Истощение запасов АТФ. АТФ играет центральную роль в жизнеобеспечении клетки, выступая в качестве и субстрата для биосинтеза, и главного источника энергии. АТФ необходим для синтеза нуклеиновых кислот, процесса мышечных сокращений, энергетического обеспечения и деления клеток. АТФ осуществляет деятельность ионных транспортеров. Химическая энергия высвобождается при гидролизе АТФ до АДФ или АМФ. АДФ рефосфорилируется в митохондриях АТФ-синтетазой. Многие токсиканты нарушают этот процесс (см. гл. 6–10).

Повышение уровня внутриклеточного кальция. Плазматическая мембрана непроницаема для ионов Ca^2+^. Концентрация ионов Ca^2+^ в цитозоле регулируется активностью транспортных систем, которые перекачивают их в эндоплазматический ретикулум и митохондрии.

Выявлено два типа передачи сигнала посредством ионов Ca^2+^. Первый из них — *потенциалуправляемый* — характерен для электровозбудимых, преимущественно нервных, клеток. Деполяризация их плазматической мембраны вызывает поглощение нервным окончанием ионов Ca^2+^ через потенциалзависимые кальциевые каналы. Это вызывает секрецию нейромедиатора. Второй тип передачи сигнала посредством ионов Ca^2+^ — *рецепторуправляемый* — заключается в следующем. Синтез вторичных мессенджеров (вследствие связывания сигнальной молекулы с рецептором на поверхности клетки) приводит к высвобождению из внутриклеточного депо ионов Ca^2+^, эффекторные ферменты активируются и происходит запуск кальцийопосредованных внутриклеточных реакций. Агонисты могут регулировать оба известных типа передачи сигнала посредством ионов Ca^2+^.

Токсиканты увеличивают уровень цитоплазматического кальция путем усиления потока кальция внутрь клетки и/или ослабления потока из клетки. Открытие рецептор- или потенциалуправляемых кальциевых каналов

или повреждение плазматической мембраны приводит к тому, что в клетку по градиенту концентрации из внеклеточного пространства устремляются ионы Ca^2+^ (концентрация ионов Ca^2+^ в межклеточной жидкости равна примерно 10^–3^ М). Уровень ионов Ca^2+^ может повышаться также при выкачивании кальция из эндоплазматического ретикулума и митохондрий. Повышенное содержание ионов Ca^2+^ оказывает токсическое действие на клетку, проявляющееся истощением энергетических запасов (ингибирование АТФазы), дисфункцией микрофиламентов и микронитей (цитоскелет), активацией гидролитических ферментов и генерацией АФК.

Из-за высокого уровня цитоплазматического кальция усиливается поток ионов внутрь митохондрий. В результате отрицательный потенциал мембраны митохондрий исчезает, что приводит к остановке процесса синтеза АТФ. Кроме того, химические агенты, окисляющие НАДН, активируют транспортер, выкачивающий кальций из матрикса. Повышенный уровень цитоплазматического кальция повреждает микрофиламенты. Происходит разрушение актиновых нитей: отделяются нити α-актинина и фодрина, ответственные за прикрепление микрофиламентов к плазматической мембране. В результате в мембране появляются разрывы. Высокий уровень ионов кальция приводит к активации гидролитических ферментов, разрушающих белки, фосфолипиды и нуклеиновые кислоты. В частности, кальцийактивируемые нейтральные протеазы разрушают встроенные мембранные белки. Неизбирательная активация фосфолипаз ионами кальция приводит к повреждению клеточной мембраны, одновременно происходит образование детергентов из фосфолипидов. Активация Ca^2+^, Mg^2+^-зависимых эндонуклеаз вызывает фрагментацию хроматина.

Генерирование АФК и/или активных форм азота. Многие ксенобиотики способны генерировать АФК (см. гл. 6–10), например, кальций активирует дегидрогеназы цитратного цикла, повышается скорость переноса электронов, в результате чего увеличивается количество O~2~^•^¯ и H~2~O~2~, активация NO-синтетазы приводит к синтезу $ONOO^-$ и т.д.

Механизмы повреждения клеточных структур взаимосвязаны:

* истощение клеточных запасов АТФ приводит к остановке работы ионных насосов клеточной мембраны и эндоплазматического ретикулума, что вызывает повышение уровня ионов кальция. Усиливается поток кальция в митохондрии — исчезает разность потенциалов — блокируется синтез АТФ; * гиперкальциемия облегчает образование АФК, что, в свою очередь, инактивирует кальциевые насосы, тем самым усиливая гиперкальциемию; * АФК также могут истощать запасы АТФ. NO^+^ — катион нитрония (производное NO˙) инактивирует глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, ухудшает гликолиз, необратимо ингибирует часть компонентов цепи переноса электронов; * ион $ONOO^-$ может стимулировать одиночные разрывы цепей ДНК, активируя поли-АДФ-рибозополимеразу (PARP). Этот фермент многократно переносит АДФ-рибозу с НАД^+^ на ядерные белки. В результате уменьшается количество НАД^+^, необходимого для синтеза АТФ. Для ресинтеза НАД^+^ необходим АТФ. Недостаток НАД^+^ приводит к потенцированию действия $ONOO^-$ на ДНК.

Нарушение митохондриальных процессов: некроз и апоптоз

Некроз. Приток ионов кальция в митохондрию приводит к увеличению проницаемости внутренней мембраны митохондрий (до размеров частиц 1500 Д). Такие изменения обеспечивают переход протонов в матрикс митохондрии, полностью устраняя мембранный потенциал. Поврежденная митохондрия уже не способна синтезировать АТФ, но деполяризация мембран реверсирует АТФазу, и она начинает гидролизовать АТФ. Происходит бессмысленная трата энергии. Теперь под угрозу ставится процесс гликолиза, так как для некоторых стадий необходим АТФ (гексокиназа, фосфофруктокиназа). Тотальное истощение энергетических запасов приводит к лизису или некрозу клетки.

Апоптоз. Химические агенты способны нарушать регуляцию апоптоза клеток — генетически запрограммированного процесса, при котором клетка активно способствует своей гибели. Апоптоз является механизмом активного удаления поврежденных клеток и способом восстановления структуры ткани. Апоптоз запускается через специальные «рецепторы смерти» на поверхности клетки или нерецепторным путем, что ведет к активации регуляторных белков, которые останавливают митотическую активность клетки, вызывают фрагментацию ДНК (эндонуклеазы), деградацию жизненно важных белков (каскад протеолитических ферментов, каспаз), нарушают связь клетки с внеклеточным матриксом и т.д. Ранним проявлением апоптоза являются падение электрохимического

потенциала митохондриальной мембраны и повышение продукции АФК. Морфологически апоптоз характеризуется образованием мембранных пузырей, агрегацией хроматина вблизи ядерной мембраны, конденсацией и фрагментацией клетки с образованием апоптотических телец с последующим их фагоцитозом. Конечным этапом является полный распад клетки. В отличие от некроза при апоптозе не возникает выраженной воспалительной реакции.

Чаще всего процесс гибели клетки связан с деградацией митохондрий. Другой путь — выход в цитоплазму цитохрома *c* (*cyt c*), гемсодержащего белка, который обычно находится на поверхности внутренней мембраны в митохондриальном межмембранном пространстве. *Cyt c* — последний компонент цепи переноса электронов, его отсутствие полностью блокирует синтез АТФ. Происходит увеличение содержания O~2~^•^¯, и начинается процесс некроза. Одновременно свободный *cyt c* является запускающим фактором апоптоза. *Cyt c* после соединения с АТФ и специфическим белком может стимулировать протеолитический распад белков под действием каспаз (цистеиновых протеаз). Некоторые каспазы активируют прокаспазы. Это ведет к активации так называемых эффекторных каспаз, которые расщепляют определенные клеточные белки, активируя или инактивируя их.

Основные пути клеточной смерти — через повреждение митохондрий или запуск *cyt c* — контролируются семейством белков *Bcl*-2. Среди этих белков присутствуют те, которые облегчают протекание процессов клеточной смерти, например *Bax, Bad* и *Bid*, и те, которые ингибируют этот процесс, например *Bcl*-2, *Bcl-xL*. Соотношение антагонистических белков является «переключателем» между жизнью и смертью клетки. Проапоптические белки *Bax* и *Bid* являются инициаторами реакций апоптоза. Они запускают цепь реакций, ведущих к деградации структуры ДНК, через активацию мембранных рецепторов семейства *Fas*. Повреждение ДНК вызывает стабилизацию и активацию *p*53-белка, который усиливает синтез *Bax*-белка (проапоптотического белка), что в конечном счете связано с риском появления мутаций и канцерогенеза. Поэтому апоптоз является *природным механизмом защиты*. Возбуждение *Fas*-рецепторов может непосредственно активировать каспазы и вовлекать митохондрии в процесс разрушения клеточных структур (программа каспаззависимой активации *Bid*).

Таким образом, апоптоз реализуется разными путями, но в любом случае при участии каспаз. Реализация апоптоза в каждом конкретном случае зависит от инициирующего фактора и состояния клетки.

Форму клеточной смерти определяет наличие АТФ. Многие токсиканты могут вызывать и апоптоз, и некроз. Апоптоз обычно индуцируется при воздействии низких концентраций токсикантов, при высоких концентрациях развивается некроз. Исследования показали, что решающим фактором является количество свободного АТФ. Когда повреждается небольшая часть митохондрий, они лизируются и процесс останавливается. Когда же происходит разрушение значительной части митохондрий, механизм аутолиза не срабатывает, а высвобождающийся *cyt c* запускает процесс активации каспаз и апоптоз. При вовлечении в процесс всех митохондрий запасы АТФ полностью истощаются и процесс апоптоза не может запуститься (для запуска необходима энергия). Происходит цитолиз.

Этап 4 — восстановление или повреждение?

Этап 4 в развитии токсического процесса обусловлен неадекватным восстановлением поврежденных структур. Многие токсиканты повреждают макромолекулы, что увеличивает масштаб альтерации и способствует развитию токсического эффекта.

Поврежденные молекулы могут быть восстановлены различными способами, например окисление тиоловых белков или метилирование ДНК может быть полностью устранено. После химического повреждения ДНК и пероксидного окисления жиров клетка гидролитически удаляет поврежденную часть. В некоторых случаях поврежденная молекула полностью деградирует, и необходим повторный синтез.

Восстановление белков. Тиоредоксин и глутаредоксин способны восстанавливать в белках окисленные тиольные группы (дисульфидные), способствуя поддержанию редокс-гомеостаза. Восстановление белков происходит и при участии восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН). Восстановление окисленного гемоглобина осуществляется путем передачи электронов с цитохрома *b*5, последний регенерируется при участии НАДН-зависимой цитохром *b*5-редуктазы. Молекулы индуцибельных *шаперонов* (БТШ) активно синтезируются в ответ на денатурацию белков. Они восстанавливают структуру поврежденных белков. Последние

уничтожаются протеолизом. АТФ / убихинон-зависимые протеолитические системы контролируют уровень регуляторных белков (например, *p*53, *IkB*, циклинов), которые элиминируют поврежденные внутриклеточные белки.

Восстановление жиров. Окисленные жиры восстанавливаются в ходе сложного процесса, включающего ферменты класса редуктаз, глутатионпероксидазу и глутатионредуктазу. Для регенерации редуктаз необходим НАДФН.

Восстановление ДНК. Благодаря высокой плотности упаковки и наличию механизмов репарации ядерная ДНК довольно устойчива к действию свободных радикалов и электрофилов. Митохондриальная ДНК не имеет достаточно эффективных механизмов репарации и потому более уязвима.

Участки ковалентных сшивок цепей ДНК репарируются ферментами, например ДНК-фотолиазой, которая вырезает сшитые УФ-излучением пиримидиновые основания. Этот хромофорсодержащий фермент функционирует только при освещении. Метильные группы, присоединенные к O~6~-атому гуанина, удаляются O~6~-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазой, и структура полностью восстанавливается.

Удаление участка ДНК состоит из двух процессов — удаления поврежденных оснований и нуклеозидов. Незначительные дефекты (не нарушающие спиральную структуру) опознаются и устраняются относительно специфичной ДНК-гликозилазой (гидролизует *N*-гликозидные связи и образует беспуриновые и беспиримидиновые участки). Эти участки распознаются эндонуклеазой, которая гидролизует фосфорно-эфирные связи. После удаления поврежденного участка структура восстанавливается ДНК-полимеразой и ДНК-лигазой. Крупные участки удаляются АТФ-зависимой нуклеазой. Этот фермент распознает искаженные участки и вырезает его вместе с частью неповрежденных нуклеотидов (с обеих сторон от поврежденного участка). Вырезанный участок ДНК восстанавливается путем вставок нуклеотидов ДНК-полимеразами и лигазами. Вторая нить используется как шаблон.

PARP, вероятно, является важным инструментом репарации. Этот фермент присоединяется и активируется поврежденными участками ДНК. Активная *PARP* гидролизует НАД^+^ и использует освободившуюся АДФ-рибозу для формирования на ядерных белках цепей поли-АДФ-рибозы. Так как АДФ-рибоза заряжена отрицательно, то получающаяся цепь также заряжается отрицательно. Цепи ДНК содержат много анионных частиц. Одноименный заряд приводит к расхождению цепей ДНК и молекул ядерных белков, происходит деконденсация хроматиновой структуры. Этот процесс необходим, потому что репарации подлежат только освобожденные от белков и частично раскрученные цепи ДНК.

В том случае если реплицируется поврежденная ДНК, реализуется механизм рекомбинационного (пострепликационного) восстановления. Это предотвращает синтез дефектных нитей ДНК. Результатом репликации являются две двухцепочечные молекулы ДНК: одна из них содержит длинный пострепликационный участок во вновь синтезированной цепи, другая идентична материнской ДНК. Последняя путем обмена участками (кроссовером) восстанавливает поврежденную цепь другой ДНК. Такой механизм обычно встречается при сшивках цепей ДНК.

Восстановление клеток (на примере периферических нейронов). Восстановление нейронов — крайне медленный процесс. Зрелые нейроны потеряли способность к делению, поэтому не происходит замещения поврежденных клеток здоровыми. Восстановление повреждений аксонов в периферических нейронах происходит с участием макрофагов и шванновских клеток, формирующих миелин. Макрофаги удаляют поврежденный участок, выделяют цитокины и факторы роста, активирующие шванновские клетки, на поверхности которых локализуется белок *Par*-3 в момент контакта с подлежащим миелинизации аксоном. Полярный белок *Par*-3 регулирует, как было установлено в 2005 г., процесс миелинизации. Клетки Шванна пролиферируют и запускают процесс восстановления нейронов. Дифференцированная клетка Шванна образует канал, по которому происходит рост аксона, кроме того, она выделяет факторы роста.

В ЦНС млекопитающих избыточное удлинение аксонов предотвращается ингибиторными гликопротеинами и хондроитинсульфатпротеогликанами, которые выделяются олигодендроцитами и астроцитами.

Восстановление тканей. В тканях, способных к регенерации, дефекты устраняются некрозом или апоптозом и пролиферацией.

Апоптоз может предотвращать появление новообразований, уничтожая клетки с опасными изменениями в структуре ДНК. Эффективное восстановление структуры тканей при апоптозе возможно только при замещении удаленных клеток новыми, т. е. в органах с высокой пролиферативной активностью (костный мозг, дыхательный эпителий, эпителий ЖКТ, эпидермис) или с относительно высокой — клетки печеночной и почечной паренхимы. Восстановления нейронов, кардиомиоцитов, яйцеклетки не происходит в связи с потерей способности к делению.

Ткани состоят из различных клеток и внеклеточного матрикса. Прикрепление клеток друг к другу обеспечивают кадгерины — семейство трансмембранных кальцийзависимых гликопротеинов, осуществляющих адгезивные межклеточные контакты. Пространство между клетками заполняют коннексины — нестабильные белки, живущие несколько часов. Интегрины — поверхностные гетеродимерные белки связывают клетки с внеклеточным матриксом. При восстановлении поврежденных тканей происходит регенерация клеток и компонентов внеклеточного матрикса, а также реинтеграция новых клеток в ткани и органы. Почти сразу после повреждения клеток соседние с ними клетки начинают делиться. Покоящиеся клетки (фаза *G*0) переходят в фазу *G*1. Начинается процесс митоза. В делящихся клетках происходит изменение экспрессии генов. Увеличивается экспрессия предранних генов, кодирующих *TFs*. Последние также активируют экспрессию некоторых генов. Через несколько часов экспрессируются поздние гены, кодирующие белки — регуляторы клеточного цикла. Преобладающими процессами в клетке становятся синтез ДНК и митоз.

Регенеративный процесс запускается особыми веществами, выделяемыми поврежденными клетками. Макрофаги и эндотелий, чувствительные к этим веществам, выделяют свои сигнальные молекулы, инициирующие регенерацию. Фактор некроза опухолей α (ФНОα, или *TNF*α) и интерлейкин β (*ИЛ*-β) способствуют активации покоящихся клеток, далее эти клетки под влиянием гепатоцит-ростового фактора (*HGF*) и трансформирующего ростового фактора альфа (*TGF*-α) переходят к фазе митоза.

Кроме митоза, восстановление ткани возможно за счет миграции клеток. В слизистой оболочке ЖКТ этот процесс происходит быстрее, чем рост новых клеток. Восстановление слизистой оболочки управляется факторами роста и цитокинами.

Восстановление внеклеточного матрикса. Внеклеточный матрикс состоит из белков, гликозаминогликанов, гликопротеинов и протеогликанов. Активация покоящихся звездчатых клеток происходит под влиянием тромбоцитарного ростового фактора и *TGF*-β, которые выделяются при разрушении тромбоцитов. Пролиферация звездчатых клеток вызывается сильным митогеном *тромбоцитарного ростового фактора,* в то время как TGF-β вызывает усиление синтеза звездчатыми клетками элементов внеклеточного матрикса (коллагенов, фибронектина, тенасцина, протеогликанов).

Побочные реакции при повреждении тканей

Макрофаги и эндотелиоциты выделяют большое количество веществ, среди которых белки острой фазы (БОФ) воспаления, приводящие к развитию воспаления и лихорадки. В ответ на повреждение тканей макрофаги выделяют цитокины (ФНОα, ИЛ-1), нарушающие процессы микроциркуляции и способствующие развитию воспаления. Цитокины стимулируют ближайшие стромальные клетки (эндотелиоциты, фибробласты), которые начинают выделять медиаторы, расслабляющие микрокапилляры и вызывающие увеличение проницаемости сосудистой стенки. Активированные эндотелиоциты облегчают переход лейкоцитов в поврежденные ткани (под действием хемоаттрактантов и молекул клеточной адгезии). Адгезия лейкоцитов к эндотелиальным клеткам обеспечивается внутриклеточными молекулами адгезии (*ICAM*-1). После фазы адгезии происходит выход лейкоцитов через сосудистую стенку в ткани. Он облегчается разностью концентраций хемоаттрактантов, усиливающих в лейкоцитах синтез интегринов. Хемоаттрактантами являются хемотаксические цитокины (хемокины) — производные липидов, например тромбоцитактивирующий фактор и лейкотриен В4 (*LTB4*). Клетка любого типа, находящаяся вблизи места повреждения, выделяет *ICAM*-1, которые вызывают выход лейкоцитов в ткани. Лейкоциты синтезируют медиаторы, способствующие развитию воспалительного процесса.

В процессе воспаления генерируются АФК. В организме АФК выполняют ряд позитивных функций, связанных с их включением в продуцирование энергии, фагоцитоз, регулирование клеточного роста и межклеточной коммуникации. Например, одним из этапов естественного защитного механизма является генерация фагоцитами

существенных количеств O~2~^•^⁻. В поврежденных тканях макрофаги инициируют процесс выделения большого количества свободных радикалов и активных ферментов. Мембранная НАДФН-оксидаза после активации макрофагами и/ или гранулоцитами также продуцирует супероксидный анион-радикал O~2~^•^⁻, который затем превращается в гидроксидный радикал. NO макрофаги синтезируют путем окисления аргинина NO-синтетазой. Далее радикалы реагируют друг с другом и образуют другие свободные радикалы — NO~2~^•^ и CO~3~^•^⁻. Гранулоциты выделяют во внеклеточное пространство миелопероксидазу, катализирующую образование HOCl из пероксида водорода и хлорид-иона. HOCl при взаимодействии с Fe^2+^ или O~2~^•^⁻ образует гидроксильный радикал. Все свободные радикалы усиливают воспаление, одновременно препятствуя микробному заражению.

Цитокины макрофагов и эндотелиоцитов — ИЛ-6, ИЛ-1, ФНОα, действуя на мембранные рецепторы, усиливают экспрессию генов, кодирующих положительные и отрицательные БОФ.

Положительные БОФ способствуют уменьшению повреждения тканей и запускают процессы регенерации. Одним из способов их действия является ингибирование лизосомальных ферментов.

К отрицательным БОФ относятся альбумин, транстиретин, трансферрин, некоторые формы цитохрома *P*450 и глутатион-S-трансферазы. Они влияют на концентрацию химических агентов и определяют их место накопления в острую фазу. Эти белки играют важную роль в детоксикации, а иногда и усилении токсичности ксенобиотиков.

Генерализованные реакции

Цитокины активированных макрофагов и эндотелиоцитов изменяют нейрогормональный статус. ИЛ-1, ФНОα и ИЛ-6 действуют на температурный центр в гипоталамусе. Одновременно ИЛ-1 и ИЛ-6 усиливают продукцию АКТГ, стимулирующего выход кортизола из надпочечников. Обеспечивается и обратная связь — кортизол ингибирует синтез цитокинов.

Системы восстановления иногда не способны выявить повреждение. Регенерации не будет, если повреждаются кофакторы и ферменты системы восстановления, а также при ковалентном связывании ксенобиотиков с белками.

Возможен случай, когда системы восстановления усиливают токсический эффект. Примеры — истощение запасов НАД^+^ под действием *PARP* при восстановлении ДНК или расходование НАДФН на восстановление окисленных белков. Из-за истощения запасов доноров электронов под угрозу ставится процесс синтеза АТФ.
При неконтролируемой пролиферации также возможно усиление токсического эффекта, что может привести к новообразованиям и фиброзу.

Неэффективность процессов регенерации

Отсутствие или неэффективность процессов регенерации может встречаться на всех уровнях (молекулярном, клеточном, тканевом).

Повреждение клеток заканчивается клеточной смертью при неэффективности процессов восстановления или необратимости повреждений. Развитие некроза могут остановить два механизма: апоптоз и пролиферация. Апоптоз предотвращает воспаление. Пролиферация запускается вскоре после повреждения ткани. Этот процесс способствует восстановлению структуры и функций ткани. Чувствительность тканей к повреждающим факторам и способность к восстановлению изменяются во времени и определяют выживание клеток. Эффективность репарации также зависит от концентрации токсиканта, но не только потому, что токсикант вызывает сильное повреждение клеток, но и из-за нарушения самих механизмов восстановления. *При неэффективности механизмов восстановления клеток и отсутствии апоптоза и митоза развивается некроз.*

Фиброз — патологический процесс, характеризующийся чрезмерным образованием межклеточного матрикса ненормального состава. Как уже было сказано, повреждение клеток запускает процессы пролиферации и ресинтеза компонентов межклеточного матрикса. Если последний процесс по каким-то причинам не останавливается, то развивается фиброз. Главным фактором фиброгенеза является *TGF*-β. Повышенное образование этого вещества в острую фазу — нормальный ответ на повреждение тканей. Его синтез прекращается по завершении процессов регенерации. Фиброзная активность *TGF*-β обусловлена стимуляцией синтеза и ингибированием деградации компонентов межклеточного матрикса. В процессе фиброза происходит изменение состава межклеточного

матрикса. Непропорционально увеличено количество коллагенов и ламинина — адгезивного гликопротеина, полипептидные цепи которого ассоциированы в форме асимметричного креста и удерживаются вместе дисульфидными связями.

Канцерогенез. Химические канцерогены нарушают процессы репарации ДНК, апоптоза и терминации клеточной пролиферации.

Повреждение репарации ДНК. *Химические и физические факторы могут вызывать неопластическую трансформацию клеток посредством генотоксических и негенотоксических механизмов.* Химические агенты, действующие на ДНК, вызывают образование аддуктов, оксиление, сшивки цепей. Если эти повреждения не устраняются, появляются мутации и новые цепи ДНК уже будут отличаться от материнских. Наиболее неблагоприятная ситуация — экспрессия поврежденными генами белков-регуляторов клеточного деления. Такие клетки способны к сверхнормальному росту и вытесняют здоровые структуры. Результатом является образование опухоли.

Протоонкогены — это гены, кодирующие белки-регуляторы клеточного цикла. Белки-регуляторы включают факторы роста, рецепторы к факторам роста, внутриклеточные системы передачи сигнала (*G*-белки, протеинкиназы, циклины, циклинзависимые протеинкиназы) и *TFs*. Периодическое увеличение экспрессии этих генов необходимо для обеспечения клеточного цикла. Постоянное усиление активности протоонкогенов вызывает неоплазию. *Изменение структуры протоонкогенов — это генотоксический механизм повреждений.* Поврежденный ген (онкоген) запускает процесс усиленного синтеза белков-регуляторов. Примером мутационной активации онкогенных белков могут служить *Ras*-белки. Они расположены на внутренней поверхности клеточной мембраны, и в их функции входит синтез трансмиттеров в ответ на действие рецепторов факторов роста. *Ras* — молекулярный «переключатель», активный в ГТФ-форме и неактивный в ГДФ-форме. Некоторые мутации кодирующего его гена приводят к снижению активности ГТФазы. Белок более продолжительное время остается в форме ГТФ. Постоянный синтез медиаторов приводит к неконтролируемой пролиферации и трансформации.

Мутации в опухоль-подавляющих генах. Эти гены кодируют белки, замедляющие все фазы клеточного цикла, — ингибиторы циклинзависимых протеинкиназ, *TFs*. Ген *p*53 кодирует белок массой 53 000 Д.
Он активирует экспрессию генов, кодирующих вещества — ингибиторы клеточного цикла. Одновременно он провоцирует апоптоз (блокада антиапоптотических факторов и активация проапоптотических). Повреждение ДНК и неисправимые мутации стабилизируют белок *p*53. Происходит его накопление, замедляется клеточный цикл, облегчается репарация или запускается апоптоз.

Накопление мутаций в протоонкогенах и опухольподавляющих генах — основной механизм злокачественной трансформации клеток. Так как жизнь клеток регулируется равновесием митоза и апоптоза, то любые изменения в генетической программе могут привести к смещению этого равновесия. Облегчение процессов апоптоза препятствует развитию опухоли, и наоборот. Усиленная митотическая активность провоцирует канцерогенез по следующим причинам.

* Увеличивается вероятность мутаций. При сокращении длительности фаз клеточного цикла уменьшается время, достаточное для репарации. * Избыточный синтез протоонкогенных белков, увеличивая вероятность их связывания с онкогенными белками, облегчает неопластическую трансформацию. На ранних этапах развития опухоли в период многоклональной гиперплазии под воздействием генетических или других факторов повышается активность метилтрансферазы, что выражается в гиперметилировании ДНК, приводит к транскрипционной инактивации и генетической нестабильности гиперметилированных участков. Изменения закрепляются и развиваются при дальнейшем росте опухолевых клеток. Последовательные события разбалансировки метилирования приводят к подавлению транскрипции генов или потере их функций путем разрушения или повреждения хромосом. * Клеточные взаимодействия в процессе пролиферации временно прекращаются, что приводит к инвазивному росту опухолевых клеток.

2.3. Генный полиморфизм и индивидуальная химическая чувствительность. Метаболомика и метабономика

Плоть человека — свиток, на котором
отмечены все даты бытия.

Максимилиан Александрович Волошин (1877–1932),
известный русский и советский поэт-символист,
переводчик, художник-пейзажист, критик

Кому неведомо всегдашнее несоответствие
между тем, что человек ищет и что находит?

Никколо Макиавелли (1469–1527),
итальянский (флорентийский) дипломат, писатель,
философ, автор военно-теоретических трудов

Модификация генетического материала человека химическими агентами представляет одно из наиболее серьезных последствий воздействия токсикантов. Однако число агентов или процессов, которые известны как приводящие к таким изменениям, ограничено.

К настоящему времени генотоксиканты выявлены среди ароматических соединений и их галогенопроизводных, полихлорированных дифенилов и ароматических полициклов, простых и сложных эфиров (например, эфиры фталевой кислоты), галогенированных алифатических углеводородов, нитрозаминов, фенолов, пестицидов различной химической природы.

Генотоксичность — это способность химических, физических и биологических факторов оказывать повреждающее действие на генетические структуры организма.

Химические агенты инициируют последовательность событий, которая начинается с рецептора, сдерживающего / активизирующего генную и протеиновую экспрессию.

Экспрессия гена — это активизация транскрипции гена, в процессе которой на смысловой нити ДНК синтезируется мРНК.

Поскольку мРНК — предшественники ферментов, то измерение их относительного содержания в образцах ткани или клеток, подверженных действию токсиканта, показывает потенциальное вовлечение генов в этиологию токсичности. *Образец экспрессии генов гораздо более информативен для выявления конкретных типов повреждений по сравнению с определением метаболита или активности единичного фермента,* так как содержание метаболитов и активность ферментов могут быть изменены под влиянием многих факторов (см. гл. 3).

Использование микронабора ДНК, с помощью которого можно измерить уровень экспрессии в тысячах генов одновременно, значительно повысило чувствительность и специфичность диагностических тестов (рис. 2-3).

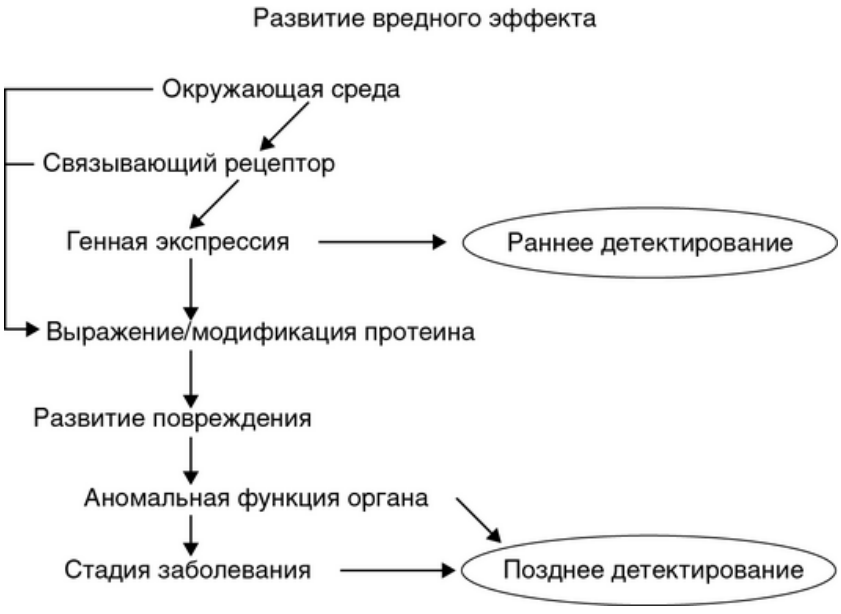


Рис. 2-3. Определение экспрессии генов как диагностический и прогностический тест

Высокоспецифичные изменения экспрессии генов помогают установить механизм токсичности химического агента, например, последовательность передачи сигнала или причины ингибирования ферментных систем, следовательно, определить эффективные биомаркеры, предупредить лекарственные взаимодействия, предвидеть побочные эффекты.

Достижения медицинской науки ежегодно приводят к внедрению новых лекарственных средств. В мультицентровых клинических испытаниях MERIT-HF, COMET, OASIS, ATLAS, PREVENTMARS, FATS, CLAPT, LRT, EXCEL и ряде других сообщается о значительной распространенности нежелательных реакций на лекарственные средства различных групп.

Часто развитие таких реакций обусловлено высокой концентрацией лекарственных средств в плазме крови вследствие полиморфизма генов, кодирующих ферменты биотрансформации и транспортеров. В настоящее время согласно концепции доказательной медицины в доклинических исследованиях новых лекарственных средств необходимо учитывать их влияние на состояние ферментной системы биотрансформации и транспортеров. При проведении клинических испытаний отбор пациентов должен проводиться с учетом генотипа изоферментов метаболизма. В диагностических целях доступно применение около 200 генетических тестов, и их число увеличивается с каждым годом. Во всех развитых странах значительно возросли требования к объему и качеству токсикогенетической информации, целью которых является стандартизация критериев необходимости и достаточности генетических исследований при изучении токсического действия различных ксенобиотиков.

Соотношение экспрессии генов и фенотипа

Фенотип может быть определен с помощью функциональных тестов, измерения компонентов сыворотки крови, гистологической оценки тканей и т.д. Взаимосвязь совокупности параметров экспрессии генов с данными клинических исследований — ключ к поиску биомаркеров токсических эффектов и формированию гипотезы относительно механизма действия токсиканта. Например, для многих токсикантов почка является мишенью, что связано с ее анатомическим строением и физиологическими функциями. В табл. 2-1 приведены некоторые вещества различной химической природы, оказывающие токсическое действие на почку (подробнее см. гл. 1).

Таблица 2-1. Вещества различной химической природы, оказывающие токсическое действие на почку

Металл	Галогенопроизводные углеводородов	Природный токсин	Лекарственные препараты
Кадмий	Бромобензол	Охратоксин А	Анальгетики, НПВП* Парацетамол и другие НПВП
Ртуть	Тетрахлорметан	Фумонизин	Антибиотики Гентамицин, митомицин, циклоспорин
Свинец	Хлороформ	Цитрин	Другие лекарственные препараты Цисплатин

* Нестероидные противовоспалительные препараты.

Для оценки изменений генной экспрессии, которые происходят под влиянием классических почечных токсикантов, были проведены токсикогенетические исследования. Мишенью цисплатина — *цис*-дихлородиамин платины(II) — (*CIS*) и охратоксина А (*OTA*) является сегмент проксимального канальца S3. *CIS* токсичен для представителей всех биологических видов. Его токсичность может выявляться несколькими способами, включающими измерение креатинина плазмы, мочевины крови и т.д. *OTA* — токсин, выделенный из особых видов грибов, включающих *Aspergillus ochraeus* и *Penicillium verrucosum*, которые присутствуют во множестве различных продуктов и напитков, таких как зерновые, орехи, специи, кофе и красное вино (см. гл. 10). Проводили независимые исследования генной экспрессии в почке при воздействии токсическими дозами *CIS* и OTA. При этом наблюдали почти одинаковые гистопатологические изменения, включающие некроз S3-клеток проксимального канальца и рассеянный апоптоз. Оба соединения накапливались в определенной области проксимального канальца. Гистологическая оценка послужила отправной точкой проверки взаимосвязи параметров генной экспрессии и морфологических повреждений. Анализировали гены крыс, которым вводили *CIS*, и крыс, которым вводили OTA. Несмотря на то что в

исследование включили только 250 генов, было обнаружено несколько функциональных классов генов, которые могут быть удовлетворительными биомаркерами. Таким образом, структурно и фармакологически разные соединения, делящие одни и те же токсикологические конечные точки, имеют сходство и в экспрессии генов.

Кандидаты в биомаркеры должны соответствовать многим требованиям, включая возможность раннего детектирования, при этом гены, протеиновые продукты которых секретируются в кровяное русло, являются лучшими кандидатами по сравнению с другими биомаркерами. Использование высокоточных технологий определения экспрессии генов может дать в ближайшее время ответы на многие вопросы, например:

* различные биологические виды проявляют лишь частично совпадающие или индивидуальные черты генного ответа на действие одного и того же токсиканта? * возможно ли использование полученных данных для определения срока введения токсиканта и оценки риска? * можно ли использовать изменения генной экспрессии как индикаторы ответных реакций на введение смесей химических веществ? * существуют ли уникальные ответные реакции организма на хроническое поступление низких доз токсикантов? * существует ли возможность обнаружения специфических характеристик генного полиморфизма, характеризующих повышенную склонность к экологически обусловленным заболеваниям?

Интерпретация изменений экспрессии генов возможна лишь в совокупности с данными клинической химии, гистологических исследований и других параметров, определяющих фенотип.

К генотоксикантам относят:

* мутагены — агенты различного происхождения, вызывающие наследуемые изменения в геноме; * митогены — факторы или вещества, влияющие на процессы клеточного деления; * анэугены — факторы, способствующие увеличению или уменьшению гаплоидного или диплоидного числа хромосом на одну или более; * кластогены — факторы, индуцирующие хромосомные разрывы; * морфогены — факторы, вызывающие ненаследуемые генетические изменения (морфозы) на уровне реализации признака в онтогенезе.

Механизмы индуцирования генетических изменений

Типы повреждений ДНК варьируют от разрыва одной или двух спиралей ДНК до пересечений между основаниями ДНК, между участками ДНК и белками, а также путем получения аддуктов ДНК при взаимодействии азотистых оснований с химическими агентами, либо опосредованно через интеркаляцию химического соединения между парными основаниями. Алкилирование основания может привести к его отрыву от молекулы ДНК с образованием беспуринового или беспиримидинового участка, который обычно называется АП-сайтом (участком). Включение посторонних оснований в АП-сайт приводит к мутациям. Эндогенные агенты ответственны за несколько тысяч повреждений ДНК, ежедневно происходящих в каждой клетке, преимущественно — за изменения оснований ДНК (например, 8-оксигуаниновых) и образование АП-сайтов. Клеточные процессы, которые могут привести к повреждениям ДНК — это избыточное накопление АФК, дезаминирование цитозинов и/ или S-метилцитозинов, приводящее к образованию соответственно урацила и тимина.

Процесс репликации ДНК чреват возможными ошибками, например полимеразой может быть добавлено постороннее основание.

Два вида процессов помогают клетке устранять повреждения своей ДНК. Если повреждения значительны, то клетка может войти в стадию апоптоза. Если повреждение менее значительно, то в клетке происходят процессы восстановления: безошибочная или чреватая ошибками репарация (починка) ДНК.

Основные этапы большинства процессов репарации ДНК — это:

* распознавание повреждения; * устранение повреждения (за исключением разрыва спиралей или расщепления пиримидиновых димеров); * синтез репарированной ДНК; * лигация (образование связей).

Возникновение генных мутаций

Генная (точковая) мутация представляет собой изменение последовательности нуклеотидов в пределах одного гена, приводящее к изменению характера действия гена.

Точковые мутации можно разделить на несколько типов в зависимости от характера молекулярного изменения в гене.

* Missense-мутация. В одном из триплетов происходит замена одного основания (например, ЦТТ→ГТТ), в результате чего измененный триплет кодирует аминокислоту, отличную от той, которую кодировал прежний триплет. Замены основания подразделяются на «переходы», при которых одно пуриновое основание заменяется другим пуриновым или одно пиримидиновое — другим пиримидиновым, и «трансверсии». * Мутация со сдвигом рамки считывания. Если в последовательность ДНК включается новое основание или пара оснований, то все лежащие за ними триплеты изменяются, что влечет за собой изменение синтезируемого полипептида. Среди этих мутаций наиболее значительная часть продуцируется ошибками репликации ДНК. * Nonsense-мутация. В результате замены одного основания возникает новый триплет, представляющий собой терминирующий кодон. В генетическом коде имеется три таких триплета. При подобной замене цепь отличается по своим свойствам от полипептида, который синтезировался прежде. * Синонимическая missence-мутация. Генетический код обладает значительной избыточностью: два или несколько его триплетов кодируют одну и ту же аминокислоту. Поэтому можно ожидать, что в некоторых случаях при замене оснований один триплет заменяется другим — синонимическим, кодирующим ту же аминокислоту. Такие синонимические мутации, вероятно, довольно обычны.

Относительная частота мутаций — это результат состязания между починкой и репликацией. Чем больше починок, которые производятся перед репликацией, тем меньше частота мутаций для данного количества индуцированных повреждений ДНК. Значимыми регуляторами этого состязания являются проверочные гены клеточного цикла (например, ген *p*53), поскольку если клетка не допускается для входа в *S*-фазу на проверочном пункте *G*1 / *S*, то возможно большее число починок, прежде чем клетка начнет воспроизводить свою ДНК. Важным моментом в оценке генных мутаций, индуцированных химическими агентами, является отношение между продолжительностью нанесения повреждения и длительностью репликации ДНК (т. е. если повреждение нанесено, может ли оно быть починено до репликации).

Одни методы обнаружения генных изменений определяют прямые мутации, другие методы — обратные. *Прямые мутации* — это генетические изменения в первозданном гене, и они обнаруживают себя изменением фенотипа. *Обратная мутация* восстанавливает функцию гена в мутанте и приводит к возвращению первозданного фенотипа.

Многие соединения, которые сами по себе не являются мутагенными или канцерогенными, могут превратиться в мутагены и канцерогены вследствие обмена веществ в организме. Частично совпадающие или индивидуальные характеристики генного ответа на определенный токсикант используют не только для выработки стратегии лечения экологически обусловленных заболеваний, выбора лекарственной терапии, но и для адекватной интерпретации результатов судебно-химической экспертизы или клинико-токсикологического исследования. Вот несколько примеров. Гены алкогольдегидрогеназы печени представлены тремя полиморфными локусами (*ADH*-1, *ADH*-2, *ADH*-3), альдегиддегидрогеназы — двумя (*ALDH*-1 и *ALDH*-2). Специфические реакции на алкоголь (тахикардия, жжение в желудке, мышечная слабость и др.) людей, у которых отсутствует изоформа *ALDH*-1, объясняют наследственными вариациями в молекулах двух ферментов, расщепляющих этанол. У некоторых больных при ингаляционном наркозе (фторотан и др.) появляется злокачественная гипертермия (температура тела повышается до 44 °С), развиваются тахикардия, гипоксия, ацидоз, гиперкалиемия, что связано с мутацией в гене рианодинового рецептора и других генах. В хирургии для мышечной релаксации применяется дитилин, который действует по типу яда кураре (остановка дыхания) и быстро разлагается сывороточной холинэстеразой. Если холинэстераза атипичная из-за мутации в соответствующем гене, то при введении дитилина происходит остановка дыхания на 1 ч (в течение этого времени необходима искусственная вентиляция легких). Поэтому эксперт, делающий заключение по такого рода химико-токсикологическим исследованиям, должен учитывать генетические особенности потерпевшего.

Любые фармакогенетические реакции человека развиваются на основе эволюционно сформировавшегося генетического полиморфизма. Хорошо известна значительная вариабельность эффективности и побочных действий лекарств у разных групп населения и отдельных лиц. Клинические испытания лекарственных препаратов проводятся для выявления побочных эффектов у 1 из 500 человек или 1 из 1000 человек, и маловероятно, что они учитываются у 1 из 50 000. Становится ясно, что чем более специализировано новое лекарство, тем более вероятно «выпадение» определенного числа пациентов из успешного лечения. При введении стандартной дозы лекарства его концентрация в крови у одних людей через

определенный промежуток времени оказывается ниже оптимальной, а у других достигает токсического уровня. Вариабельность генома человека (2,85 млрд пар оснований), по современным оценкам, составляет 2–10 млн пар оснований, часть из которых и определяет индивидуальные особенности ответа на воздействие химического агента.

Таким образом, индивидуальная переносимость химических соединений обусловлена генетическими особенностями каждого индивидуума. Воздействие токсикантов на организм реализуется через реакции, осуществляемые специфическими ферментативными системами клеток. Превращение исходной молекулы токсиканта в цепи метаболических реакций фазы I (см. гл. 3) осуществляется в основном изоферментами цитохрома *P*450 и реже — флавинсодержащими монооксигеназами и алкогольдегидрогеназами. Вариабельность некоторых цитохромов суперсемейства цитохромов *P*450 обусловливает различную скорость биотрансформации ксенобиотиков. Так называемые быстрая и медленная группы пациентов отличаются по показателям накопления и выведения химических соединений в 10–100 раз. Большинство каскадов реакций с участием микросомальных ферментов имеют в качестве терминального звена цитохром *P*450. В организме цитохром *P*450 существует в виде множества изоформ (на сегодняшний день известно около 400), кодируемых различными генами. Эти белки обладают различной, иногда перекрывающейся субстратной специфичностью и различными механизмами регуляции экспрессии (большинство изоформ цитохрома являются индуцируемыми, т. е. их количество в клетках значительно увеличивается при появлении субстрата).

В соответствии с принятой номенклатурой семейства обозначаются римскими цифрами, подсемейства — заглавными буквами латинского алфавита, а отдельные изоформы (индивидуальные ферменты) — арабскими цифрамиИзоферменты цитохрома *P*450 с идентичностью аминокислотного состава более 40% объединены в 36 семейств (12 из них обнаружены у млекопитающих), а с идентичностью аминокислотного состава более 55% — в 39 подсемейств. Семейства цитохромов *P*450 принято обозначать римскими цифрами, подсемейства — римскими цифрами и латинской буквой. Отдельные изоферменты обозначают следующим образом: сначала арабская цифра, обозначающая семейство, далее латинская буква, обозначающая подсемейство, и в конце — арабская цифра, соответствующая изоферменту. Например, изофермент цитохрома *P*450, обозначающийся как *CYP*2*D*6, принадлежит к семейству 2, подсемейству II*D* (Кукес В. Г., 2004).. В биотрансформации ксенобиотиков принимают участие изоферменты трех семейств (I, II и III).

Изоферменты семейства I ответственны за метаболизм полициклических углеводородов, гетероциклических соединений, ароматических аминов у позвоночных; индуцируются диоксином. Изоферменты семейства II ответственны за метаболизм лекарств и химических веществ окружающей среды у позвоночных и беспозвоночных. Изоферменты семейства III ответственны за метаболизм лекарств и химических веществ окружающей среды у позвоночных.

Каждая изоформа имеет специфический спектр метаболизируемых субстратов, но при этом одно и то же соединение может метаболизироваться различными изоформами *P*450 с образованием как одинаковых, так и различающихся продуктов. В зависимости от преобладания в клетке той или иной изоформы может меняться и состав продуктов реакции, в частности соотношение продуктов активации и детоксикации. У генов ряда изоформ существуют аллельные варианты с различной ферментативной активностью белка-продукта. Наличие таких аллелей в значительной степени обусловливает существование внутривидовых и межтканевых различий в чувствительности к токсикантам. Есть 39 генов, которые кодируют изоформы цитохрома *P*450. Три семейства (I, II и III) включают 19 изоформ.

Полиморфизм был выявлен в нескольких изоформах (*CYP*2*D*6, *CYP*2*C*9, *CYP*2*C*19, *CYP*2*E*1 и *CYP*3*A*4). *Генный полиморфизм, связанный в особенности с CYP2D6, важен с токсикологической точки зрения.* Например, есть препараты, для которых биотрансформация в организме регулируется этим ферментом (опиаты, β-блокаторы, антиаритмические препараты и антидепрессанты). Другие препараты действуют как ингибиторы этого фермента (метадон, декстропропоксифен). У пациентов с мутациями в *CYP*2*D*6 происходит нарушение метаболизма препаратов, и они имеют тенденцию накапливаться в организме.

Следовательно, значительно возрастает риск токсичности, если доза не подобрана согласно генотипу. Другой пример. Основным метаболитом кодеина, декстрометорфана и этилморфина является морфин. Приблизительно 7% представителей народов Кавказа имеют дефицит фермента, обеспечивающего метаболический путь указанных

веществ. В связи с этим у таких людей образуется недостаточное количество морфина и анальгезирующий эффект проявляется слабее. Еще примеры. *CYP*1*A*1 — ген, кодирующий фермент арилуглеводородгидроксилазу (*AHH* — aryl hydrocarbon hydroxylase) из суперсемейства цитохромов *P*450. Субстратом для этой изоформы являются вещества, содержащиеся в табачном дыме, которые при оксигенировании превращаются в токсичные производные фенола и различные эпоксиды. На сегодняшний день идентифицировано четыре полиморфизма в гене *CYP*1*A*1. Цитохром *CYP*1*A*2 участвует в метаболической активации проканцерогенных ариламинов и гетероциклических аминов, образующихся при термической обработке пищи. Фермент клеток печени, который участвует в метаболизме амфетаминов, сердечных гликозидов, нитрозаминов и ряда других веществ, кодируется геном *CYP*2*D*6. У 5–10% европеоидов в зависимости от ареала проживания такой фермент отсутствует.

Примером фермента, не принадлежащего к группе цитохромов, является *NADPH-хиноноксидоредуктаза 1* (ген *NQO1*). *NQO*1 играет ключевую роль в детоксикации бензола, инактивируя хиноны, образующиеся в результате метаболизма. Обнаружено два полиморфных сайта в гене *NQO*1: *C*609*T* (*NQO*1*2) и *T*464*C* (*NQO*1*3). Полиморфизм *NQOP*2 можно считать нонсенс-мутацией, так как он приводит к появлению стоп-кодона и отсутствию белка-продукта, однако частота встречаемости его в различных популяциях варьирует (13–30%). Аллель *NQO*1*3 встречается реже, его частота не превышает 5%. Для фермента этого аллеля показано снижение энзиматической активности в 2 раза по сравнению с нормальным ферментом, который катализирует превращение хинонов в гидрохиноны, подвергающиеся затем конъюгации и выведению. При этом предотвращается образование полухиноновых радикалов с последующим формированием АФК. Экспрессия гена *NQO*1 индуцируется окислительным стрессом, влиянием циклических углеводородов табачного дыма и промышленных акрилатов.

Достижения молекулярной биологии и медицины последних лет изменили представления о системе биотрансформации и транспортеров токсикантов, цель функционирования которой — предотвращение проникновения токсикантов в системный кровоток, органы и ткани, снижение их биологической активности, уменьшение липофильности и повышение гидрофильности для облегчения выведения и удаления (экскреции) из организма. Активность ферментов биотрансформации и системы транспортеров (специализированных белков-переносчиков) — главный лимитирующий фактор метаболических процессов в организме. Транспорт ксенобиотиков играет значительную роль в развитии токсического эффекта. Белки, осуществляющие транспорт, являются детерминантами распределения токсиканта. Один из наиболее изученных транспортных белков — *трансмембранный белок P-гликопротеин* — АТФ-зависимый насос, основными функциями которого являются препятствие всасыванию токсикантов в тонком кишечнике и предотвращение их проникновения через гистогематические барьеры при попадании в организм, а также скорейшее выведение печенью в желчь и почками в мочу. *P*-гликопротеин является продуктом гена *MDR*1, для которого характерен полиморфизм.

Ген *MDR*1, кодирующий *P*-гликопротеин, принадлежит к генам, отвечающим за клеточную защиту. Его гиперэкспрессия определяет устойчивость клетки к ряду химиотерапевтических препаратов, известную как *множественная лекарственная устойчивость*. В систему биотрансформации и транспортеров токсикантов включены ферменты фаз I и II биотрансформации, а также транспортеры органических анионов и катионов, осуществляющие выведение токсикантов печенью в желчь и почками в мочу (см. гл. 3). Для генов, кодирующих эти белки, так же как и для гена *MDR*1, характерен полиморфизм.

Субстрат, окисленный при участии цитохрома *P*450 или какого-либо другого фермента, далее подвергается воздействию ферментов конъюгации, катализирующих включение в молекулу вещества водорастворимых остатков: глутатиона, серной кислоты и др. (фаза II, см. гл. 3). В результате метаболит становится гидрофильным и выводится из организма с мочой. На этом этапе работают S-трансферазы, эпоксидгидролазы, УДФ-глюкуронилтрансферазы и ацетилтрансферазы. В случае сниженной активности такого фермента, например вследствие присутствия специфического аллеля гена, в клетке будет происходить накопление продуктов фазы I биотрансформации и, соответственно, повышаться риск повреждения ДНК. Ряд веществ под действием ферментных систем фазы II биотрансформации способен превращаться в активные канцерогенные метаболиты. Например, гидрирование эпоксидгидролазами 7,8-оксида бензапирена до гидродиола с дальнейшим образованием из него диолэпоксида приводит к активации молекулы и превращению ее непосредственно в канцерогенный метаболит (см. гл. 3 и 9). Введение глюкуроновой кислоты в продукт фазы I биотрансформации — важнейшая реакция детоксикации

соединений. Два генных семейства кодируют изоформы глюкуронозилтрансферазы: *UGT*1 и *UGT*2. Мутация изоформы (*UGT*1*A*1) приводит к гипербилирубинемии, что связано с последующими нарушениями метаболизма.

Суперсемейство GST — это глутатион-S-трансферазы. *GST* участвуют в активации и детоксикации многих ксенобиотиков. Например, токсичность парацетамола в больших дозах связана с истощением печеночного глутатионового депо. Функциональная роль глутатион-трансфераз заключается в ферментативной конъюгации сульфгидрильной группы с электрофильными центрами молекул ксенобиотиков или их метаболитов, образовавшихся в процессе фазы I. Подобная детоксикация играет ключевую роль в обеспечении резистентности клеток к ПОЛ, алкилированию белков и другим процессам с участием свободных радикалов. Существует несколько классов глутатионтрансфераз в зависимости от субстрата и органной принадлежности ферментов. Их синтез контролируется генами, расположенными на различных хромосомах. Для каждого из них описано несколько видов полиморфизма, который влияет на функциональную активность ферментов. Так, отмечена высокая распространенность у людей генного полиморфизма для нескольких *GST*, что, как считают специалисты, связано с увеличением риска развития рака, обусловленного действием экотоксикантов (см. гл. 9).

В метаболизме гетероциклических ароматических аминов у человека важную роль играет *ариламин-N-ацетилтрансфераза (NAT).* Этот фермент катализирует ацетилирование ароматических и гетероциклических аминов и относится к ферментам фазы II биотрансформации ксенобиотиков. Известны две изоформы *NAT* человека — *NAT*1 и *NAT*2. *NAT*2 обладает меньшей специфичностью и метаболизирует более широкий круг веществ, экспрессируется преимущественно в клетках печени, а также синтезируется в тканях, например, молочной железы. По фенотипическим проявлениям активности *NAT*2 людей можно разделить на быстрые, промежуточные и медленные ацетиляторы (ранее выделяли только группы быстрых и медленных ацетиляторов). В настоящее время известно 36 аллелей гена *NAT*2, которые различаются сочетанием 12 миссенс-мутаций, 4 молчащих мутаций и делеции одного нуклеотида, приводящей к сдвигу рамки считывания. Частоты встречаемости аллелей *NAT*2 значительно варьируют в разных популяциях. К наиболее распространенным среди европеоидов медленным аллелям относятся кластеры *NAT*2*5 (*T*341*C*) и *NAT*2*6 (*G*590*A*) (в скобках указана характерная мутация). Кластер *NAT*2*7 (*G*857*A*) представлен в основном у монголоидов, а *NAT*2*14 (*G*191*A*) — только у представителей экваториальной расы. Изменение скорости ацетилирования связано с токсическими эффектами ксенобиотиков, относящихся к ариламинам, гетероциклическим аминам, гидразинам.

Сульфатирование и *метилирование* — также важные пути метаболизма многих ксенобиотиков. Сульфотрансферазы (*SULT*, *SULT*1 и *SULT*2) и метилтрансферазы [метилтрансфераза (*MT*), катехол-О-метилтрансфераза (*COMT*), метилтрансфераза тиопурина (*TPMT*) и триметилтрансфераза (*TMT*)] катализируют эти реакции. В настоящее время для этих ферментов идентифицировано несколько видов полиморфизма, но их клиническое проявление еще неясно.

Степень канцерогенного воздействия химических соединений на уровне их метаболизма определяется балансом активирующих и детоксифицирующих реакций, осуществляемых полиморфными ферментными системами. Клеточные защитные механизмы против избыточного накопления АФК включают следующие ферменты: глутатион-пероксидазу, каталазу и семейство супероксиддисмутаз. Mn-*SOD* синтезируется в цитозоле и после посттрансляционной модификации транспортируется в митохондрии. В гене Mn-*SOD* присутствует однонуклеотидный полиморфизм (*GTT–GCT*), приводящий к замене 16 аминокислоты (Val–Ala) в сигнальном пептиде, теряемом в процессе посттрансляционной модификации. При подобной замене происходит изменение вторичной структуры белка (трехскладчатый слой вместо α-спирали) и нарушается транспорт фермента в митохондрию.

Вклад генетических факторов в вариабельность ответной реакции организма на введение токсиканта составляет от 20 до 95%. На сегодняшний день накоплено множество примеров, показывающих, что эти различия обусловлены вариантами нуклеотидной последовательности генов, кодирующих ферменты биотрансформации токсикантов, молекулы-переносчики лекарств и рецепторы, взаимодействующие с лекарствами. В отличие от других факторов наследственная детерминированность ответа остается постоянной на протяжении всей жизни индивида.

Определение генного полиморфизма ферментов — основа выявления индивидуальной химической чувствительности

Биочипы были изобретены в конце 90-х годов XX в. в России и США. История создания отечественного биочипа связана с именем академика РАН А. Мирзабекова, рано ушедшего из жизни (1937–2003). В настоящее время технология биочипирования активно используется для определения экспрессионных профилей работы генов и определения однонуклеотидных замен (вариабельных локусов ДНК), являющихся признаками конкретного генотипа. Эта технология позволяет проводить высокочувствительный, селективный, экспрессный, производительный и информативный анализ, составляя основу генетической паспортизации населения. Биочипирование дает возможность определять индивидуальный полиморфный профиль ферментов, например цитохрома *P*450. *Биологические микрочипы (biochips)* или, как их чаще называют, DNA microarrays, — организованное размещение молекул ДНК на специальном носителе — платформе, пластинке из стекла или пластика площадью около 1 см^2^, на которой в определенном порядке расположены ячейки (до 1 млн на 1 см^2^), содержащие иммобилизованные одноцепочечные олигонуклеотиды с уникальной последовательностью оснований. Базовым принципом для создания ДНК-чипов является линейное узнавание стереокомплементарных оснований (*A — T / U, G — C*) нуклеиновых кислот (ДНК или РНК). Олигонуклеотиды чипа гибридизуются с меченными, например, флуоресцентной меткой, наборами молекул ДНК или РНК. Спустя некоторое время платформу промывают. Если в наборе имеется олигонуклеотид, комплементарный закрепленному в ячейке, то между ними образуется водородная связь, и при промывании такой нуклеотид не будет удален, в отличие от тех, которым не нашлось комплементарных оснований. Затем производится детекция наличия меченых молекул в ячейках. Информация считывается с помощью флуоресцентного микроскопа или специального лазерного устройства для чтения. Способы изготовления биочипов бывают разными, например способом фотолитографии с использованием специальных микромасок и лазера, аналогично изготовлению электронных чипов. На одном чипе расположены десятки (а иногда и сотни) тысяч пятен размером в несколько микрометров. Каждое пятно — это один уникальный фрагмент ДНК длиной в десятки нуклеотидов. Изготовленный таким образом биочип в дальнейшем гибридизуют с меченными красителем молекулами ДНК. После гибридизации на биочипе возникают паттерны — причудливые узоры, различающиеся у нормальных и поврежденных клеток. Сопоставив структуры взаимодействующих с исследуемым образцом олигонуклеотидов и интенсивность сигнала, получают информацию о последовательности меченой молекулы ДНК (РНК) или о наличии и количестве искомой последовательности в образце. По виду паттернов можно с большой вероятностью на самой ранней стадии предсказать течение патологического процесса.

Как регулируется активность отдельных генов в рамках генома как целого? Технологии биочипирования позволяют определить функциональное состояние всех генов: какие гены работают в данной клетке на какой-либо стадии развития, какие находятся в неактивном состоянии, а также установить взаимосвязь сигнальных регуляторных путей клетки. На биочипах проводят одновременный анализ работы тысяч и десятков тысяч генов и сравнивают экспрессию этих генов в здоровых и в поврежденных клетках. Такие исследования помогают увидеть (сразу, за один эксперимент!) влияние различных ксенобиотиков на работу десятков тысяч генов и выяснить, на какие гены и каким образом они действуют. В настоящее время разрабатывают «белковые» микрочипы для определения протеома.

В России разработаны биочипы, позволяющие при биологической угрозе (см. гл. 10) определять возбудители сибирской язвы, оспы, чумы и бруцеллеза как наиболее вероятные для использования в качестве биооружия. В США для американской армии разработан специальный биочип, сигнализирующий о наличии бактериальной угрозы. Если на такой биочип попадает ДНК патогенных микробов, то фрагменты ДНК зондов с прикрепленными к ним микроскопическими частицами золота выстраиваются в ряд, между электродами идет ток, и биочип сигнализирует об угрозе.

В последние годы произошел значительный прогресс в методах определения генотипов (в *SNP*-анализе). Согласно принятому определению, *SNP (single nucleotide polymorphisms)* — это однонуклеотидные позиции в геномной ДНК, для которых в популяции имеются различные варианты последовательностей (аллели), причем редкий аллель встречается с частотой не менее 1%. Иногда дополнительно определяются «распространенные *SNP*», для которых частота встречаемости редкого аллеля более 20%. Практический интерес к *SNP* сильно возрос в ходе реализации проектов по определению полных нуклеотидных последовательностей ряда модельных организмов. В самом определении *SNP* заложена ориентация на их использование в качестве генетических маркеров (ограничение по частоте встречаемости противопоставляет их редким мутациям). Огромное количество *SNP* в геноме человека (по различным оценкам, 3–10 млн распространенных *SNP*) позволяет отобрать порядка 100 000 *SNP*-маркеров;

при этом на каждый известный или предполагаемый ген приходится в среднем по два маркера. Никакой другой тип геномных различий не способен обеспечить такую плотность картирования. Скрининг *SNP* — это основа стандартного подхода к исследованию молекулярной природы индивидуальной химической чувствительности.

Для идентификации генетических изменений используют различные методы детекции *SNP*, например ферментативные, химические (расщепление или лигирование), методы, основанные на различной электрофоретической подвижности полиморфных участков ДНК (секвенирование ДНК), хроматографию (например, высокоэффективную жидкостную хроматографию — ВЭЖХ), МС, резонансное тушение флуоресценции и др.

Альтернативой существующим методам детекции полиморфных участков ДНК является масс-спектрометрическое дифференциальное секвенирование. Время, затрачиваемое на анализ каждого образца этим методом, составляет всего несколько секунд и позволяет оценить долю *SNP* при анализе нескольких образцов одновременно. Ионизированные молекулы ДНК отрываются от подложки методами *MALDI* (matrix-assisted laser desorption / ionisation) — лазерной десорбционной ионизации или *ESI* (electrospray ionisation) — электроспрейной ионизации (см. гл. 5). Молекулы ДНК разгоняются в электрическом поле и направляются через вакуумную камеру к детектору. Время движения регистрируется. Время обратно пропорционально скорости фрагмента молекулы, которая, в свою очередь, прямо пропорциональна отношению массы фрагмента молекулы к его заряду. Эти параметры (отношение массы к заряду) уникальны для каждой молекулы нуклеиновой кислоты и определяются исключительно ее нуклеотидной последовательностью, поэтому чувствительность метода чрезвычайно высока. Метод позволяет работать с нанолитрами образца.

Постгеномные технологии — геномика, протеомика, метаболомика, метабономика имеют большие возможности для определения качественных и количественных изменений метаболических процессов в организме человека при воздействии токсикантов. Генетический код генерирует сигналы *(транскриптом*), определяющие состав протеома, который, в свою очередь, устанавливает каталитические факторы метаболизма. *Метаболом описывает совокупность метаболических процессов в каждой клетке, ткани, биологической жидкости или организме в целом.* По существу, метаболом регулирует геном посредством специальных белково-метаболических взаимодействий, которые прямым или косвенным путем контролируют генную транскрипцию. В биосистемах существует много примеров таких генов, которые регулируются промежуточными или конечными продуктами метаболизма посредством обратной связи. Самыми изученными регуляторными системами в организме млекопитающих являются метаболизм холестерина и метаболизм глюкозы. Оксид азота(II) и кислород как продукты метаболических превращений также участвуют в регуляции транскрипции генов.

Токсичные вещества, взаимодействующие с ДНК, мРНК и белками, определяют *конечный (реальный) метаболом* биологических систем, тогда как геном и протеом определяют лишь *возможный метаболом* (рис. 2-4).

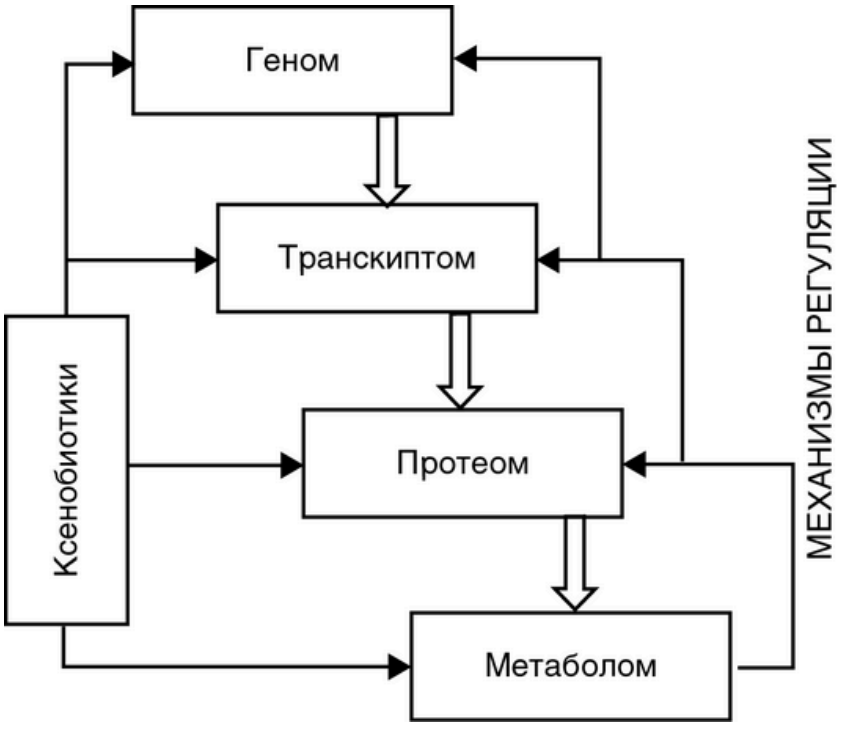


Рис. 2-4. Схема взаимодействий: от генома к метаболому

Определения терминов «метаболомика» и других «омиков» не являются строгими в научном смысле. Подобно геномам и протеомам существуют различные метаболомы, содержащиеся как в клетках одноклеточных организмов, так и в клетках тканей многоклеточных организмов. Существуют метаболомы и в биологических жидкостях — моче, спинномозговой жидкости и плазме, в которых можно обнаружить различные метаболиты при нормальных метаболических процессах и при воздействии токсикантов на организм. Новейший тандемный метод — *ядерно-магнитный резонанс в совокупности с масс-спектрометрией* (ЯМР-МС) является основным инструментом для подобных исследований (см. гл. 5).

В метаболических исследованиях используют два подхода к применению ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) и ЯМР-МС. Первый подход объединен под общим названием *«***метаболомика***»*. Этот термин подразумевает *совокупность технологий идентификации всех эндогенных соединений и метаболитов ксенобиотиков.* Второй подход разработан Д. Николсоном с сотрудниками и назван **метабономикой***.* Этот термин подразумевает *совокупность технологий идентификации в биологических жидкостях эндогенных соединений и метаболитов ксенобиотиков, характеризующих конкретное патологическое состояние организма, и построение моделей различных патологических состояний.* Метаболомика и метабономика позволяют отличить «нормальный» метаболизм от «измененного». В токсикологических исследованиях используются оба подхода. В конечном счете в результате исследования важно ответить на ключевые вопросы: чем различаются белки больной и нормальной клетки, какой вред нанесен клетке и как это связано с определенным патологическим состоянием?

«Метаболическое профилирование» и «биохимическое профилирование» — также широко используемые термины для описания метаболических исследований. Метаболическое профилирование является способом определения состава и/ или количества небольших молекул в биологическом объекте. Анализ может включать один или несколько технологических приемов, таких как ВЭЖХ, газовая хроматография (ГХ), капиллярный электрофорез (КЭФ), МС и ЯМР (см. гл. 5). Исторически профилирование эндогенных метаболитов сводилось к определению специфических соединений или типов соединений. Например, после приема красного вина органические кислоты в моче или флавоноиды в крови могут быть обнаружены несколькими методами — ГХ-МС, ВЭЖХ-МС или ЯМР. Таким образом получался «снимок» уровня метаболитов в определенное время и в определенном состоянии. В настоящее время метаболическое профилирование должно быть рассмотрено уже в составе (системе) метаболома. Современные аналитические технологии позволяют это выполнить, однако пока существует серьезная проблема, которая заключается в разработке единых (стандартных) аналитических методик определения и регистрации результатов при исследовании биологических объектов. Для определения большого количества метаболитов стали использовать МС и ЯМР, их разновидности, комбинированные методы, например ВЭЖХ-МС-ЯМР. Данные, полученные в этих исследованиях для воссоздания реально происходящих процессов *in vivo*, опираются на установление полной структуры определяемых веществ (см. гл. 5). Во многих токсикологических исследованиях в результате мониторинга процессов, происходящих в организме в ответ на действие токсиканта, отмечается, что изменения в метаболизме предшествуют гистологическим изменениям.

В начале 2007 г. было сообщено о создании базы данных и компьютерной модели, в которых впервые представлены все известные биохимические реакции, происходящие в организме человека, и связи активности многих генов с обменом веществ и последующей выработкой соответствующих белков, ферментов и метаболитов. Разумеется, карты отдельных метаболических циклов существовали и раньше, однако такая работа по глобальному обобщению проделана впервые. База данных, которая теперь будет постоянно пополняться, сегодня включает 5300 различных химических реакций. Биохимические реакции и их взаимосвязи описаны для каждого известного типа клеток организма. В компьютерную модель можно вводить различные исходные данные и на выходе получать результаты в виде концентрации тех или иных веществ. Для испытания системы были использованы 288 различных ситуаций, в частности, синтезы тестостерона и эстрогена, а также метаболизм жиров, поступающих в организм с пищей. Модель имеет общий характер, и сегодня использовать ее с учетом особенностей индивидов пока непросто.

В настоящее время метаболомические исследования применяются и для разработки новых лекарственных средств. Так, в США, Японии и Евросоюзе организованы небольшие компании с целью выполнения различных метаболомических исследований для крупных фармацевтических фирм, занимающихся разработкой новых

лекарственных препаратов. Одна из задач этих компаний заключается в быстром получении ранних метаболических маркеров токсичности (или безопасности) лекарственных средств. Другая задача заключается в открытии новых метаболических маркеров, образующихся в организме человека в ответ на действие химического агента, которые могут в дальнейшем использоваться для выявления индивидуальной химической чувствительности.

Заключение

* Взаимодействие токсиканта с эндогенными молекулами-мишенями может вызвать нарушения функции клеток (и/или структур) или запустить механизмы восстановления на молекулярном, клеточном и/ или тканевом уровнях. * Селективное связывание токсиканта с рецепторами одного типа характерно для небольшого числа высокотоксичных агентов. Чаще токсикант имеет сродство к нескольким рецепторам, взаимодействие с которыми приводит к формированию определенного биологического эффекта. * Повышенное содержание внутриклеточного кальция опасно, так как может привести к истощению энергетических запасов клетки (ингибирование АТФазы, участвующей в окислительном фосфорилировании), дисфункции микрофиламентов, активации гидролитических ферментов, избыточной генерации АФК. * Повреждение клетки ведет к ее некрозу, если молекулярные механизмы восстановления неэффективны или молекулярное повреждение необратимо. * Определение генного полиморфизма ферментов служит основой для выявления индивидуальной химической чувствительности. Новые высокопроизводительные технологии позволяют оценивать риск действия различных токсикантов в зависимости от индивидуального гено- и фенотипа, прогнозировать индивидуальную химическую чувствительность. * Масс-спектрометрический анализ полиморфизма ДНК — эффективный способ анализа с очень низкой стоимостью одного определения и высокой производительностью. Возможность мультиплексного определения мутаций или замен позволяет определять до 1 млн точек в день. * Современные аналитические технологии — метаболомика и метабономика — позволяют отличить нормальный метаболизм от измененного. Получение наиболее полной информации о метаболоме клетки — путь к объяснению клеточных реакций на поступление химических агентов. Ведь «природа проста и не роскошествует излишествами» (И. Ньютон).

Глава 3. Метаболизм токсикантов (хемобиокинетика)

Настанет время, когда наши потомки
будут удивляться, что мы не знали
таких очевидных вещей.

Луций Анней Сенека
Младший (4 г. до н.э.–65 г. н.э.)
древнеримский философ, поэт,
государственный деятель

Термин «**метаболизм**» включает описание всех этапов (абсорбция, распределение, накопление, биотрансформация и выведение) пребывания токсиканта в организме (рис. 3-1), но не отражает временну́ю зависимость течения любого из них. Термины «биотрансформация» и «метаболизм» не являются синонимами, хотя нередко в литературе их используют именно так. Б. А. Курляндским и В. А. Филовым был предложен новый термин — *хемобиокинетика* (кинетика химического вещества в биологическом объекте). Согласно определению авторов, **хемобиокинетика** — это раздел токсикологии о путях поступления, механизмах всасывания, распределения, биотрансформации в организме и выведения токсичных химических веществ. Далее в тексте термины «метаболизм» и «хемобиокинетика» используются как синонимы.

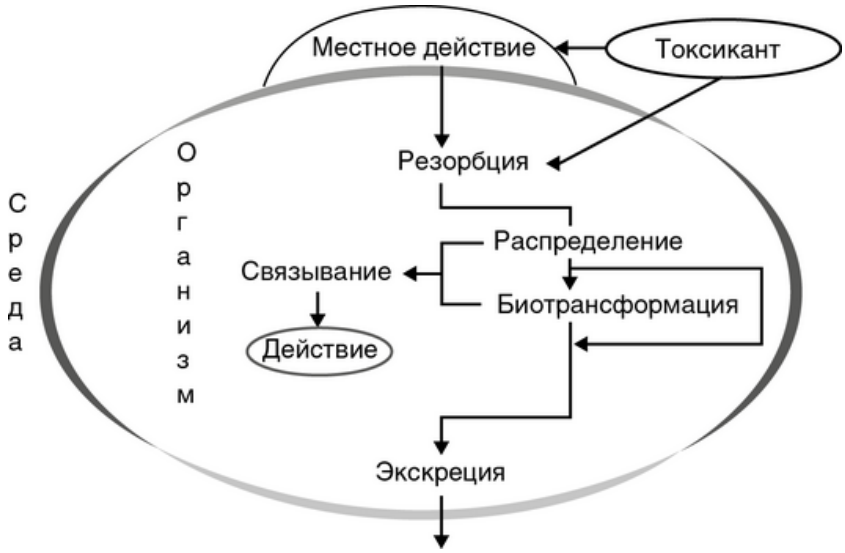


Рис. 3-1. Схема взаимодействия организм–токсикант

Метаболизм токсикантов обусловлен генетически детерминированной биохимической индивидуальностью каждого человека, наследственный полиморфизм которого сформировался под влиянием постоянно протекающих в процессе эволюции мутаций генов и отбора. У человека существует генетический контроль над метаболизмом поступающих в организм химических соединений. Гены предрасположенности в зависимости от их роли в метаболических процессах и особенностей субстратов ферментативных реакций подразделяют на гены метаболизма, гены-триггеры (гены трансдукции, или переноса сигнала) и гены клеточных рецепторов. Понимание механизмов влияния генетических факторов на проявление токсического эффекта стало возможным лишь в связи с развитием методов молекулярной биологии и реализацией программы «Геном человека» (см. гл. 2).

Изучение механизмов формирования токсических эффектов при взаимодействии ксенобиотика с организмом и закономерностей проявления токсического процесса (см. гл. 2) является задачей **токсикодинамики** — одного из разделов токсикологии.

Токсикант и биообъект образуют сложную систему, которой присущи такие свойства, как иерархичность, незамкнутость, диссипация, неустойчивость, неравновесность и нелинейность**.**

Токсикокинетика (раздел токсикологии) изучает качественные и количественные закономерности поступления, резорбции (абсорбции), распределения, накопления, биотрансформации ксенобиотиков в организме и выведения продуктов их катаболизма. На токсикокинетические процессы влияют природа токсиканта, гистофизиологические и биохимические характеристики организма (табл. 3-1), что будет показано далее на конкретных примерах при изложении глав 6–10.

Главная задача токсикокинетики — установить, каким образом доза и способ воздействия вещества на организм влияют на развитие токсического процесса.

Ответ метаболических структур и морфофункциональных комплексов организма на химическую агрессию носит кооперативный (суммарный) характер, что связано с флюктуациями, вероятностью появления бифуркацийВ неравновесной термодинамике (естественной науке, занимающейся изучением динамики и эволюции систем в окружающем нас мире) термин «бифуркация» применяется для характеристики фундаментальной особенности поведения сложных систем, подверженных сильным воздействиям и напряжениям в неравновесных состояниях и условиях. и образования диссипативных системДиссипативные системы — системы, полная энергия которых (сумма кинетической и потенциальной энергий) при движении убывает, переходя в другие виды энергии, например в теплоту, т. е. происходит диссипация энергии.. Бифуркация (от лат. bi — двойной и furca — развилка) — термин, адекватно описывающий единичное событие, которое самым решающим образом сказывается на формировании будущего. Поэтому в токсикологии так важно понятие о *критических точках* — пороговых, эффективных и среднесмертельных дозах и концентрациях.

Таблица 3-1. Влияние природы токсиканта и свойств биологических структур организма на токсикокинетику вещества

Природа токсиканта	Свойства биологических структур организма
Химическое строение, см. п. 1.2, 1.4; гл. 4–10	Наличие в биоструктурах химических соединений, способных взаимодействовать с токсикантом, см. п. 2.1, 2.2
От размера молекулы токсиканта зависит способность вещества диффундировать через поры клеточных мембран и биологические барьеры	Свойства биологических барьеров Например: толщина, наличие и размер пор в различных мембранах; возможность обеспечения *пассивного или специфического транспорта* веществ и др., см. ниже
Липофильность токсиканта определяет его способность накапливаться в соответствующих средах, см. ниже	Липофильность биологических структур (соотношение воды и жира в клетках, тканях и органах) значительно различается, см. ниже
Соотношение при определенном значении pH ионизированных и неионизированных форм молекул токсиканта определяет способ его проникновения через биологические барьеры, см. ниже	Скорость протекания биохимических процессов в организме определяется рядом факторов, в том числе генетическими особенностями организма, см. п. 2.3 и ниже

Использование токсикокинетических характеристик вещества позволяет адекватно выбрать биообъект, подлежащий химико-токсикологическому анализу, правильно интерпретировать его результаты, применить наиболее эффективный способ детоксикации. Токсикокинетические исследования необходимы при разработке новых лекарственных препаратов и при проведении их клинических испытаний.

Начиная с момента поступления ксенобиотика в организм и оканчивая выведением вещества или продуктов его метаболизма, происходят токсикокинетические процессы, которые можно разделить на три фазы. Это фазы резорбции (абсорбции), распределения и выведения вещества.

Фаза I — фаза *резорбции*, или *абсорбции,* — характеризуется проникновением вещества в кровь. В течение этой фазы концентрация вещества в крови постоянно возрастает и достигает максимума. Фаза II (α-фаза) — фаза *распределения* вещества по органам и тканям в основном за счет кровотока — характеризуется максимальным эффектом воздействия токсиканта. Концентрация вещества в плазме крови заметно снижается, в том числе за счет процессов биотрансформации. В течение фазы III (β-фазы) осуществляется *выведение* вещества или его метаболитов из организма. В этот период скорость уменьшения концентрации вещества в плазме крови снижается.

3.1. Транспорт токсикантов через биологические мембраны

Познание истины есть
посвящение в тайны бытия.

Николай Александрович Бердяев (1874–1948),
русский философ-экзистенциалист, социолог

Я наполняю сердце тишиной —
в ней скрыто множество ответов.

Клод Моне (1840–1926),
известный французский художник

Общепризнанна жидкостно-мозаичная модель мембраны клетки, предложенная Сингером и Николсоном (1972). В липидный бислой мембраны встроены молекулы гликопротеинов, определяющие ее тип и свойства, в частности проницаемость для химических веществ (см. ниже табл. 3-7). Переход веществ через биологические мембраны осуществляется путем пассивного или специфического транспорта.

1. Пассивный транспорт:

* пассивная диффузия (свободная диффузия через липидные мембраны по градиенту концентрации и диффузия по градиенту концентрации через поры — ионные каналы размером 0,3–0,4 нм); * фильтрация.

Пассивная диффузия. Скорость диффузии вещества через мембрану является функцией градиента концентрации. При этом большое значение имеют:

* площадь поверхности мембраны; * толщина мембраны; * константа диффузии токсиканта.

Константа диффузии токсиканта зависит от его липофильности, молекулярной массы, пространственной конфигурации и степени диссоциации (в случае слабого электролита).

Процесс пассивной диффузии описывается уравнением Фика. Пассивная диффузия происходит в направлении падения концентрации вещества, ведет к равномерному распределению вещества по всему занимаемому им объему, не требует затрат энергии и возможна в обоих направлениях (как в клетку, так и из нее). С ростом молекулярной массы вещества коэффициент диффузии заметно снижается. Через биологические мембраны могут проходить молекулы жирорастворимых веществ, воды и некоторых низкомолекулярных гидрофильных соединений.

Липофильные токсиканты свободно диффундируют через мембрану. С увеличением растворимости веществ в липидах их проницаемость через биологические барьеры растет, но, достигнув определенного уровня, резко снижается. Вещества с очень высокой липофильностью не проникают через мембрану, а накапливаются в ней.

Гидрофильные токсиканты не могут беспрепятственно преодолеть липидный бислой мембраны. Транспорт таких молекул возможен благодаря мембранным белкам, формирующим в липидном слое водные каналы (поры), и определяется размерами транспортируемой молекулы, но не зависит от коэффициента распределения в системе масло / вода. Если диаметр молекулы больше диаметра пор, то она не проникает через мембрану. Диффузия через поры также описывается уравнением Фика, но под диффузионной поверхностью понимают эффективную площадь пор.

Для всех ионизированных молекул, независимо от размера, липидная мембрана плохо проницаема или совсем непроницаема. Величина заряда иона имеет большее значение, чем его размер, что обусловлено как взаимодействием иона токсиканта с зарядами белковых молекул на стенках канала, так и его гидратацией в водной среде. Проницаемость мембран для двухзарядных ионов хуже, чем для однозарядных, так как степень гидратации тем выше, чем больше заряд (так, трехзарядные ионы не преодолевают биологические барьеры).

Для транспорта токсикантов, являющихся слабыми органическими кислотами и основаниями, большое значение имеет величина их p*K~a~* (см. гл. 1). Недиссоциированные молекулы таких веществ проникают через липидные мембраны и поры в соответствии с величиной коэффициента распределения в системе масло / вода. Ионы, образовавшиеся при диссоциации молекул таких веществ, через липидный бислой и поры не диффундируют.

Фильтрация — это процесс прохождения жидкости и растворенных в ней веществ с малыми размерами молекул через пористые мембраны под действием гидростатического или осмотического давления. Она осуществляется в капиллярном отделе кровеносного русла (капилляры проницаемы для низкомолекулярных веществ), в гломерулярном аппарате почек (образование первичной мочи) (см. гл. 1). Большинство токсикантов экскретируется из организма путем фильтрации (см. ниже).

2. Специфический транспорт:

* активный транспорт; * облегченная диффузия (прохождение через барьеры по градиенту концентрации с помощью специфических белков-переносчиков); * прохождение через барьеры путем цитозов.

Активный транспорт веществ через мембрану осуществляется против градиента концентрации или градиента электрохимического потенциала, требует затраты энергии и протекает в одном направлении. Известны специфические транспортные системы как для эндогенных веществ, так и для ксенобиотиков. Транспортные белки и гликопротеины играют важнейшую роль в регуляции абсорбции, распределения и экскреции многих токсикантов. Примеры — *P*-гликопротеин, основной функцией которого является энергозависимый (за счет гидролиза АТФ)

трансмембранный транспорт многих веществ;
пептиды — переносчики органических катионов и анионов, играющие важную роль в поступлении токсикантов в печень, и др.

Процесс, при котором энергия АТФ непосредственно расходуется на перемещение молекулы или иона через мембрану, — это *первичный* активный транспорт. Известно четыре типа таких процессов, которые называют *ионными насосами*:

* Na^+^ / K^+^-АТФаза; * Ca^2+^-АТФаза; * H^+^ / K^+^-АТФаза; * H^+^-АТФаза.

Принцип действия ионных насосов аналогичен работе специализированных белков-переносчиков, встроенных в мембрану — пермеаз. Механизм работы пермеазы заключается в специфическом связывании переносимого вещества на внешней поверхности мембраны, последующего фосфорилирования с помощью АТФ и изменения конформации пермеазы, в результате чего переносимое соединение оказывается внутри клетки. Белки ионного насоса могут находиться в двух конформациях. Например, в одной конформации белок связывает три иона натрия, в другой — два иона калия.

Вторичный активный транспорт включает два транспортных механизма:

* первичную активно-транспортную систему (например, транспорт Na^+^, нуждающийся в энергии АТФ); * сопряженный процесс облегченной диффузии другого вещества в противоположном направлении (например, транспорт аминокислот).

Облегченная диффузия — это процесс прохождения молекул вещества через барьеры по градиенту концентрации с помощью специальных белков-переносчиков. Этот процесс специфичен и протекает с более высокой скоростью, чем пассивная диффузия. Скорость транспорта веществ облегченной диффузией зависит от трансмембранного градиента концентраций переносимого вещества, скорости связывания вещества переносчиком на одной поверхности мембраны, от количества белков-переносчиков в мембране, скорости их конформационных изменений, в результате которых вещество переносится через мембрану (например, с внешней поверхности) и высвобождается на другой поверхности мембраны (например, внутренней). После уравнивания концентрации вещества по обе стороны мембраны процесс транспорта прекращается. В отличие от активного транспорта облегченная диффузия *не требует затрат энергии.*

При облегченной диффузии, как и в процессе активного транспорта, возможен *котранспорт* — транспорт иона или молекулы, сопряженный с переносом другого иона.

Прохождение через барьеры путем *цитозов*Эндоцитоз — захват вещества клеткой (фагоцитоз, пиноцитоз, рецептор-обусловленный эндоцитоз). Экзоцитоз — выделение веществ из клетки. Трансцитоз — транспорт вещества через объем клетки. Синцитоз — слияние клеток или слияние клеток с липидными везикулами, содержащими вещество. Интрацитоз — образование везикул и их слияние внутри клетки. *включает эндоцитоз, экзоцитоз, трансцитоз, синцитоз и интрацитоз.*

Эндоцитоз. Макромолекулярные комплексы или корпускулярный материал (например, частицы металлической, асбестовой или угольной пыли, чужеродные и отмирающие собственные клетки организма, крупные вирусы, бактерии и др.) клетка захватывает с помощью *фагоцитоза* — явления поглощения и переваривания клетками корпускулярных частиц. Везикула размером в несколько микрометров, содержащая частицы, отделяется от клеточной мембраны и переносится в цитоплазму.

Капли жидкости и растворенные в ней вещества, окруженные клеточной мембраной, образуют везикулы диаметром около 0,1 мкм и захватываются клеткой (*пинозитоз*).

Рецептор-обусловленный эндоцитоз — высокоспецифичный и независимый от концентрации токсиканта процесс — состоит из нескольких этапов. Рецепторы эндоцитоза представляют собой глико- и липопротеины, липофильная часть которых связана с липидной мембраной, а гидрофильные части обращены внутрь и наружу клетки (например, акроглобулиновый / липопротеиновый рецептор — *LRP*, выполняющий функции основного рецептора эндоцитоза). Вначале молекулы транспортируемого вещества (лиганда) взаимодействуют

с липофильной частью рецептора, расположенной на внешней поверхности мембраны. При этом часть рецептора, которая находится в цитоплазме клетки, взаимодействует со специализированным белком, называемым адаптином (adaptine).

Полученный комплекс лиганда, рецептора и белка мигрирует в определенную зону мембраны, на которой уже сконцентрировались другие аналогичные комплексы, окаймленные специализированным белком — клатрином (clathrin), играющим одну из главных ролей при образовании везикул. На следующем этапе «окаймленные ямки», находящиеся на мембране, втягиваются в клетку, отделяются от мембраны, образуя везикулы. Находясь внутри клетки, везикула практически сразу теряет клатриновую оболочку и адаптины. Далее разрушается комплекс лиганда с рецептором, который встраивается обратно в структуру клеточной мембраны, т. е. осуществляется рециркуляция рецептора, а лиганд, попав во внутреннюю среду клетки, целенаправленно доставляется к ядру, аппарату Гольджи или другим органеллам, не смешиваясь с другими макромолекулами клетки. Путем рецептор-обусловленного эндоцитоза в клетку поступают высокомолекулярные вещества, регулирующие ее метаболизм (например, гормоны, факторы роста, трансферрин, липопротеины низкой плотности и др.), а также проникают некоторые токсины белковой природы (например, тетанотоксин, ботулотоксин, см. гл. 10).

Экскрецию макромолекул из клетки во внеклеточное пространство называют *экзоцитозом.*

Трансцитоз — специализированный транспорт, характерный для некоторых типов клеток (например, эпителиальных), — объединяет признаки рецептор-обусловленных эндоцитоза и экзоцитоза при участии фузогенных (от лат. fusio — слияние) мембранных белков. Везикула транспортируется через внутриклеточное пространство к противоположной мембране и выделяет свое содержимое во внеклеточное пространство (например, сосуды).

В главах 6–10 при рассмотрении свойств отдельных токсикантов даны пояснения о преобладающем механизме транспорта.

3.2. Резорбция токсикантов

Истинный химик должен быть не только
практиком и теоретиком, он должен быть философом.

Михаил Васильевич Ломоносов (1711–1765),
первый крупный русский ученый-естествоиспытатель,
энциклопедист, физик, химик, астроном, поэт,
основатель Московского университета

В организм токсиканты могут поступать *энтеральным* (перорально с последующим всасыванием в ЖКТ) и *парентеральным* путями. Парентеральные пути поступления ксенобиотиков разнообразны (внутривенный, внутриартериальный, внутримышечный, трансдермальный, ингаляционный и др.).

По своим физико-химическим свойствам большое количество веществ способно как к местному, так и к *резорбтивному*, или *системному*, действию. При внутривенном или внутриартериальном введении токсикант сразу и полностью попадает в кровоток. Если вещество оказывает повреждающее действие на месте введения (поступления), то такое воздействие называют *местным*, например действие сильных кислот и щелочей на кожу.

В зависимости от того, какой из барьеров преодолевает вещество, говорят об ингаляционном, трансдермальном, пероральном или другом пути поступления токсиканта в организм.

Резорбция (абсорбция) — процесс переноса (проникновения) токсиканта из места поступления (окружающей среды или ограниченного объема внутренней среды организма) в системный лимфо- и кровоток — происходит при всех путях введения, кроме внутрисосудистого.

На скорость и способ резорбциии токсиканта влияют многие факторы (табл. 3-2). Резорбция ксенобиотика характеризуется **коэффициентом резорбции** (*k*~рез~), который определяется долей вещества, перешедшего в системный лимфо- и кровоток из места введения.

Таблица 3-2. Факторы, влияющие на скорость и способ резорбции токсикантов

Фактор	Примечание
Морфологические особенности органа, через который осуществляется резорбция, площадь резорбирующей поверхности, кровоснабжение органа	Влияет степень наполнения желудка и кишечника, состояние кожных покровов, верхних дыхательных путей и т.д.
Индивидуальные особенности организма (пол, возраст и др.), в частности вариабельная экспрессивность *P*-гликопротеина. *P*-гликопротеин располагается на мембранах эпителиальных клеток тонкой кишки, поверхности желчных канальцев печени, проксимальных канальцах почек и эпителиальных клеток, входящих в состав гематоэнцефалического и гематотестикулярного барьеров	*P*-гликопротеин влияет на распределение ксенобиотиков за счет ограничения их абсорбции в кишечнике, облегчая выделение путем секреции с желчью и мочой. В гематоэнцефалическом барьере мозга (см. ниже) *P*-гликопротеин ограничивает аккумуляцию многих токсикантов. С вариабельной экспрессивностью *P*-гликопротеина в двенадцатиперстной кишке ассоциирован синонимичный однонуклеотидный полиморфизм (полиморфизм, который не изменяет аминокислоту) в экзоне 26 (*3435C→T*). Так, у индивидов, гомозиготных по аллелю *T*, дуоденальная экспрессия *P*-гликопротеина меньше, чем у людей с генотипом *CC* (см. рис. 3-2)
Молекулярная масса, физико-химические свойства, наличие геометрических и оптических изомеров, конформационная устойчивость токсиканта и др.	Влияет форма введения токсиканта (раствор, аэрозоль, таблетки и т.д.)
Количественные характеристики процесса резорбции: время и площадь контакта биообъекта с веществом, введенная доза токсиканта и т.д.	Скорость и полнота протекания процесса связаны с природой токсиканта и особенностями организма
Условия окружающей среды: температура, влажность воздуха, барометрическое давление, время суток в момент воздействия	При гипербарии, например, усиливается резорбция CO, алкоголя, пестицидов и других токсикантов. Эти факторы также необходимо рассматривать во взаимосвязи с природой токсиканта и особенностями организма

Резорбция через кожу

Поступление веществ через кожу осуществляется через эпидермис, сальные и потовые железы или волосяные фолликулы путем пассивной диффузии. На скорость резорбции токсикантов влияет ряд факторов (табл. 3-3).

Таблица 3-3. Основные факторы, влияющие на скорость резорбции токсикантов через кожу

Фактор	Примечание
Площадь контакта	Количество вещества, проникающего через кожу, прямо пропорционально площади контакта токсиканта с кожей
Анатомическое расположение и морфологическое состояние участка кожи	Наибольшей способностью к резорбции обладают кожа мошонки, паха и подмышечной впадины. Нарушение рогового слоя эпидермиса, снижение жировой смазки, увлажнение кожи усиливают резорбцию токсиканта
Интенсивность кровоснабжения	Скорость кровотока не оказывает значительного влияния на скорость резорбции через кожу. Однако УФ-облучение, температурный режим усиливают резорбцию токсикантов
Природа токсиканта	Липофильность, размер молекулы и другие свойства токсиканта определяют скорость его резорбции через кожу, например, сильно липофильные соединения

	через кожу не проникают. Наличие в составе токсичного агента веществ, стимулирующих кожную резорбцию, например эмульгатора, растворителя, мазевой основы и т.д., увеличивает скорость резорбции токсиканта
Другие причины	Повышение парциального давления газа-токсиканта в воздухе увеличивает скорость резорбции ксенобиотика

Резорбция через слизистые оболочки

Топография слизистых оболочек в организме человека разнообразна. Слизистые оболочки выстилают внутренние органы, сообщающиеся с внешней средой (легкие, ЖКТ, влагалище и др.), а также глаза. С поверхности слизистых оболочек, как и с поверхности кожи, происходят всасывание токсикантов и их поступление в системный кровоток.

Скорость резорбции большинства токсикантов через слизистые оболочки пищеварительного тракта определяется их растворимостью в липидах и способностью к ионизации при определенном pH среды. Некоторые токсиканты всасываются путем активного транспорта. При введении токсикантов внутрь скорость их абсорбции в разных отделах ЖКТ различная.

Резорбция в ротовой полости. В хорошо снабжаемой кровью ротовой полости (pH среды 6,6–6,9) происходит быстрое всасывание многих находящихся в молекулярной форме токсикантов, которые затем поступают в сердце, малый круг кровообращения и далее в общий кровоток. При резорбции в ротовой полости токсиканты распределяются в организме, минуя печень.

Резорбция в желудке. Резорбция токсикантов в желудке (pH среды 0,9–2,0) происходит путем простой диффузии. Липофильные вещества абсорбируются лучше, чем гидрофильные. Кислотность желудочного содержимого определяет особенности всасывания токсикантов. Например, при физиологических значениях pH среды желудка морфин присутствует исключительно в протонированной по азоту форме и практически не резорбируется из желудка. Аналогичным образом ведет себя большинство алкалоидов.

Как правило, натощак всасывание в желудке идет интенсивнее, так как взаимодействие токсиканта с компонентами пищи снижает его концентрацию и соответственно скорость диффузии в кровь. С другой стороны, прием пищи вызывает изменение pH содержимого желудка и увеличивает время эвакуации токсиканта из желудка, что часто сопровождается повышением степени резорбции. Холодные растворы токсикантов часто оказываются более токсичными, чем теплые, так как быстрее покидают желудок.

Резорбция в кишечнике. Токсиканты всасываются в кровь преимущественно в кишечнике (pH среды тонкой кишки 6,5, сока поджелудочной железы 8,6–9,0, сока тонкой кишки 5,07–7,07, толстой кишки 6,8), бóльшая часть — путем пассивной диффузии, остальные — посредством активного транспорта. В кишечнике не резорбируются сильные кислоты и основания, затруднено всасывание ионизированных молекул, содержащих четвертичный азот. Резорбция слабых кислот определяется величиной их p*K~a~*. Важно отметить, что с увеличением концентрации токсиканта в кишке повышается скорость его всасывания, но при этом сохраняется доля (процент) всосавшегося вещества.

Если вещество нерастворимо в липидах, то оно практически не проникает из кишечника в кровь. Высоколипофильные (практически нерастворимые в воде) соединения также не резорбируются в кишечнике. На резорбцию влияют и размеры молекул: чем больше молекулярная масса, тем труднее проникает вещество через эпителий кишечника.

Токсиканты резорбируются во всех отделах кишечника, что связано с его морфофункциональными особенностями. Наиболее высокая скорость всасывания наблюдается в тонкой кишке.

В настоящее время активно изучается роль *P*-гликопротеиновой системы клеточного переноса, расположенной на поверхности эпителиальных клеток тонкой кишки (см. табл. 3-2). Установлено, что *P*-гликопротеин является выкачивающим насосом, способным переносить широкий спектр соединений из внутриклеточного пространства снова во внеклеточный матрикс и таким образом снижать эффективное всасывание токсикантов. Например, если ввести лекарственный препарат лоперамид — опиоид, который обычно не влияет на ЦНС, — одновременно с квинидином (ингибитором *P*-гликопротеина), то лоперамид вызывает побочные эффекты со стороны ЦНС.

В экспериментальных моделях на животных ингибировали *P*-гликопротеин, вводили различные лекарственные средства и определяли их концентрации. При этом концентрация препаратов повышалась в 10–100 раз по сравнению с контрольной группой.

В толстой кишке скорость резорбции ниже, так как концентрация токсикантов меньше, чем в вышерасположенных отделах кишечника.

Всасывание *неорганических ионов* зависит от их природы, величины заряда и ряда физико-химических свойств. Невсосавшаяся часть токсиканта через некоторое время удаляется из ЖКТ вместе с содержимым и слизью, выстилающей стенки кишечника. Значения *k*~рез~ установлены для многих элементов, попадающих в ЖКТ в ионном виде (табл. 3-4).

На скорость и степень резорбции токсикантов на протяжении всего ЖКТ оказывают влияние эндогенные соединения (ферменты, желчные кислоты, гормоны и др.), объем и состав пищи (например, продукты, стимулирующие секрецию желудочного сока и соляной кислоты), количество принятой жидкости, интервал между приемом пищи и введением токсиканта, курение и прием алкоголя, микрофлора кишечника. Так, прием алкоголя и курение способствуют увеличению резорбции свинца в кровь почти в 2 раза, лактобактерии, энтерококки, клостридии кишечника деметилируют наркотик метамфетамин, у грудных детей возможны восстановление нитратов до нитритов под действием микроорганизмов кишечника и образование метгемоглобина (см. гл. 6–10).

Таблица 3-4. Значения *k*~рез~ элементов, находящихся в ионном виде в желудочно-кишечном тракте

Положение в Периодической системе	*k*~рез~	**Примечание**
Все элементы IA- и VIIA-групп	1,0	–
Все элементы первого и второго периодов за исключением бериллия	1,0	
Элементы IIA-группы (магний, кальций, стронций, барий, радий)	0,1–0,3	С увеличением атомной массы элемента степень резорбции токсиканта из ЖКТ в кровь снижается
Все элементы III группы за исключением бора и таллия. Элементы IVB-группы (титан, цирконий, гафний)	<< 0,05	–
Элементы IVA-группы	1–0,05	С увеличением атомной массы элемента степень резорбции токсиканта из ЖКТ в кровь снижается
Элементы VA-группы (N, P, As) за исключением сурьмы и висмута	1,0	–
Элементы VI группы	0,1–1,0	С увеличением атомной массы элемента степень резорбции токсиканта из ЖКТ в кровь снижается

При интерпретации результатов ХТА (см. гл. 4, 6–10) учитывают феномен печеночно-кишечной циркуляции токсикантов, сущность которого заключается в следующем. Конъюгаты токсикантов с глюкуроновой кислотой (см. ниже) плохо растворимы в жирах и хорошо — в воде, в связи с чем их резорбция в кишечнике затруднена. При частичном гидролизе конъюгатов концентрация липофильных молекул агликона (свободного токсиканта или его метаболита) вновь возрастает, и они обратно резорбируются в кровоток.

Резорбция в легких. Через легкие в организм поступают газообразные (парообразные, летучие) токсиканты и аэрозоли (см. гл. 7). Это происходит не только в производственных и лабораторных условиях, но и в быту, а также в связи с загрязнением окружающей среды, с химическими и другими катастрофами (см. гл. 9). Поступление веществ при вдыхании их паров зависит от природы токсиканта и ряда физиологических параметров альвеолярной вентиляции, остаточного объема легких, проницаемости для данного вещества альвеолярно-капиллярной мембраны (барьера), скорости легочного кровотока, минутного объема сердца, общего объема крови, массы легочной ткани и других показателей.

Резорбция слизистой оболочкой глаз. Контакт паров, аэрозолей или капель токсиканта со слизистой оболочкой глаза оказывает как местное, так и системное действие. Например, взаимодействие паров зарина (фосфорорганическое боевое отравляющее вещество) со слизистой оболочкой глаза не только вызывает паралич мышц зрачка, потерю способности глаза к аккомодации и ослабление зрения, но и ингибирует действие фермента холинэстеразы.

Скорость резорбции определяется природой вещества (растворимость в липидах и воде, заряд молекулы, значение p*K~a~*, размер молекулы) и особенностями липидного барьера роговицы глаза, через который легко проникают жиро- и водорастворимые вещества.

Токсикант, контактирующий с роговицей, равномерно распределяется по поверхности склеры и конъюнктивы глаз. Часть его смывается слезной жидкостью, содержащей 1,5% хлорида натрия, 0,5% альбумина и слизь, в состав которой входит лизоцим. Токсикант задерживается на роговице от нескольких секунд до 6–10 мин, его максимальное содержание в структурах глаза наблюдается в роговице, минимальное — в хрусталике. Склеротические процессы (в том числе возрастные) в сосудистой системе глаза нарушают процессы резорбции.

Резорбция из тканей

При подкожном и внутримышечном введении или через раневую поверхность токсикант также может поступить в кровь. При *подкожном* введении токсикант попадает в подкожную клетчатку, богатую жировой тканью, выступающей в качестве депо для ксенобиотика. Скорость резорбции и биодоступность токсиканта значительно меньше, чем при *внутримышечном* введении, когда вещество вначале поступает в мышцу, накапливается в ней, а затем резорбируется в кровь. В этом случае мышца служит депо для токсиканта.

Различие в концентрациях токсиканта в месте введения, окружающей ткани и крови является условием резорбции вещества в кровь и внутренние среды организма. Сеть капилляров и лимфатических сосудов хорошо развита в подкожной клетчатке и межмышечной соединительной ткани. Кровеносные капилляры — наиболее многочисленные и самые тонкие сосуды, имеющие, однако, различный просвет. Наиболее узкие капилляры (диаметром 4,5–7 мкм) находятся в поперечнополосатых мышцах, легких, нервах и т.д., более широкие (диаметром 7–11 мкм) — в коже и слизистых оболочках. В мышце человека на 1 мм^2 ^насчитывается 1400–2000 капилляров, а в коже на той же площади — 40. Пористость (диаметр пор 3–4 нм) и малая толщина стенок капилляров, огромная площадь их соприкосновения с тканями [более 6000 м^2^, медленный кровоток (0,5 мм / с), низкое артериальное давление (20–30 мм рт. ст.)] обеспечивают наилучшие условия для обменных процессов. Поверхность всасывания в тканях для липофильных соединений в сотни раз больше, чем для водорастворимых веществ, проникающих в кровь только через поры.

Резорбция токсиканта зависит и от процента функционирующих (раскрытых) капилляров и давления крови в тканях, которое регулируется вазоактивными факторами [эндотелийзависимые релаксирующие факторы, оксид азота(II), простагландины, эндогенные регуляторы — адреналин, норадреналин, ацетилхолин, серотонин]. Мембрана капилляра проницаема для водорастворимых, а также и высокомолекулярных веществ, если размер их молекул не превышает размера пор капилляра. Поэтому проникновение очень многих токсикантов в кровь вполне возможно при их введении в мышцы.

Биодоступность

При любом способе поступления токсиканта, кроме внутривенного, далеко не все количество вещества достигает кровеносного русла, так как вещество не полностью всасывается в ЖКТ, а также инактивируется печенью или экскретируется с желчью. Поэтому используют понятие **биодоступность**, т. е. степень абсорбции токсиканта в кровь при внесосудистом введении относительно внутривенного введения.

Для суждения о биодоступности обычно измеряют площадь под кривой (*AUC* — area under the concentration versus time curve), отражающей зависимость между концентрацией вещества в плазме крови и временем, поскольку этот показатель прямо пропорционален количеству вещества, попавшему в системный кровоток.

Биодоступность вещества при внутривенном введении принимают за единицу или за 100%. Реальные значения биодоступности всегда меньше единицы, что отражает частичную абсорбцию вещества в системный кровоток (табл. 3-5).

Таблица 3-5. Биодоступность вещества в зависимости от пути введения

Путь введения	Биодоступность, %	Примечание
Внутривенный	100 (по определению)	Наиболее быстрый эффект
Внутримышечный	75–100	Возможность введения больших объемов препаратов; может быть болезненным
Подкожный	75 — ≤100	Объемы введения меньше, чем при внутримышечном; может быть болезненным
Прием внутрь (оральный)	5 — <100	Наиболее удобен; может наблюдаться значительное снижение эффекта после первого прохождения токсиканта через печень
Ректальный	30 — <100	Менее заметен эффект первого прохождения через печень, чем при оральном введении
Ингаляционный	5 — <100	Часто наблюдается очень быстрое действие
Трансдермальный	80 — <100	Обычно очень медленная абсорбция; пролонгированное действие; отсутствие эффекта первого прохождения через печень

3.3. Распределение токсикантов

Искушение сдаться будет особенно
сильным незадолго до победы.

Китайская пословица

На свете – вечная борьба; кто
ухитрился жить за счет другого, тот победитель.

Франсуа-Мари Аруэ — Вольтер (1694–1778),
французский философ-просветитель,
поэт, писатель, историк

Распределение — это динамический процесс, включающий связывание молекул токсиканта с белками плазмы и форменными элементами крови, проникновение (пенетрацию) в эфферентные органы (ткани), поступление в метаболизирующие или экскретирующие органы.

После абсорбции вещества попадают в кровь, а затем в органы и ткани. *Главной характеристикой процесса распределения* токсикантов в организме является *неравномерность*. Концентрацию вещества в плазме крови в любой момент времени *t* принято рассчитывать по формуле

C = C~0~ · *e*^ — ^^*kt*^,

где *C* — концентрация вещества в любой момент времени, моль / л; *C*~0 ~— концентрация вещества в момент введения, моль / л; *k* — константа элиминации*Элиминация* включает процессы, приводящие к снижению содержания чужеродного вещества в организме. См. раздел 3.4. Выведение токсикантов.; *t* — время, прошедшее после введения вещества.

Для того чтобы рассчитать *C*~0~, нужно знать объем, в котором распределяется вещество, т. е. *объем распределения*. Объем распределения не является физиологическим объемом и может быть меньше, чем объем плазмы или крови, а для некоторых веществ — больше. *C*~0~ равно количеству вещества в организме, деленному

на объем распределения, поэтому объем распределения характеризуется отношением общего содержания вещества в организме к содержанию его в плазме.

Объем распределения (кажущийся объем распределения вещества) *V~d~* — это гипотетический объем жидкостей организма, необходимый для равномерного распределения всей дозы поступившего в организм вещества в концентрации, равной его концентрации в крови в момент исследования.

V~d~ выражается в литрах на 1 кг массы и определяется соотношением

$$V = D/C,$$

где *V* — объем распределения; *D* — доза вещества в молярных (или массовых) концентрациях на 1 кг массы тела; *C* — концентрация вещества в крови, моль / л.

Объем распределения характеризует степень проникновения веществ из плазмы крови и внеклеточной жидкости в ткани и депонирования в них (табл. 3-6). Для липофильных соединений, легко проникающих через тканевые барьеры, характерно высокое значение *V~d~*. Если вещество в основном циркулирует в крови, *V~d~* имеет низкие величины. Сильное связывание молекул токсиканта тканями приводит при расчетах к большим значениям объема распределения.

V~d~ используют при определении константы элиминации и периода полужизни, или периода полувыведения вещества *t*~1 / 2 ~(см. раздел 3.4. Выведение токсикантов).

Таблица 3-6. Диапазон значений *V~d~*

***V~d~*, л / кг**	**Примечание**
До 0,10	Высокая степень связывания токсиканта с белками плазмы
0,10–0,27	Удерживание токсиканта внеклеточной жидкостью
0,27–0,40	Поступление токсиканта во внутриклеточную жидкость
0,40–0,53	Равномерное распределение токсиканта в общей водной среде организма
Ближе к 1	Тканевая секвестрация токсиканта

Зависимость концентрации вещества в плазме крови от времени, прошедшего после его введения, — кривая *концентрация — время* характеризует токсикокинетические процессы, происходящие с исследуемым веществом. На основе зависимости концентрации вещества в крови или плазме от времени строят токсикокинетические модели, используя специальные компьютерные программы математического моделирования. Организм — сложная гетерогенная система, состоящая из большого числа *компартментов* (камер), разделенных *биологическими барьерами* (см. ниже). Для математического моделирования токсикокинетических процессов организм представляют в виде одной или нескольких частей (камер), ограниченных проницаемой мембраной, в которых равномерно распределяется токсикант. Понятие «камера» условно, так как за ним не стоит какое-либо анатомически ограниченное пространство; это единица формализованной токсикокинетической системы.

Накопление токсиканта далеко не всегда происходит в органе (ткани)-мишени, что приводит к снижению токсического эффекта. Некоторые токсиканты избирательно накапливаются в том или ином органе (ткани) или клетках определенного типа. Характер распределения токсикантов зависит от ряда причин, в том числе и от генетически детерминированных индивидуальных особенностей, что определяет вариацию токсикокинетических параметров и степень развития токсического эффекта.

Распределение токсикантов осуществляется посредством жидких сред (жидкостей) организма.

Скорость и характер распределения вещества в тканях определяется скоростью диффузии вещества через соответствующие барьеры (табл. 3-7), скоростью перфузии (интенсивностью кровотока), свойствами клеточных мембран, сродством токсикантов к молекулам-мишеням или другим химическим структурам, находящимся

в клетках. В различных органах стенки капилляров имеют различные свойства и, следовательно, различную проницаемость для химических веществ.

Токсиканты распределяются в виде молекул и ионов, некоторые из них при физиологическом значении pH крови образуют коллоидные частицы, становясь третьей формой, которая содержится в этой жидкости. Молекулы, ионы и коллоидные частицы токсикантов могут переноситься кровью разными способами:

* физически или химически связываясь с элементами крови, главным образом с эритроцитами; * физически растворяясь в плазме в свободном состоянии; * связываясь с одним или более видом белков плазмы, образуя комплексы, либо прикрепляясь к другим фракциям плазмы.

Таблица 3-7. Свойства, локализация и проницаемость различных барьеров организма (по С. А. Куценко)

Тип барьера	Локализация	Вещества, способные проникать через барьер
Липидная мембрана без пор	Слизистые оболочки полости рта, эпителий почечных канальцев, эпителий кожи, гематоэнцефалический барьер	Липофильные низкомолекулярные вещества
Липидная мембрана с порами малого диаметра (0,3–0,8 нм)	Эпителий тонкой и толстой кишки	Липофильные и низкомолекулярные (до 200 Д) водорастворимые вещества
Липидная мембрана с порами среднего диаметра (0,8–4 нм)	Слизистые оболочки глаз, носоглотки, мочевого пузыря	Липофильные и в меньшей степени гидрофильные вещества
Липидная мембрана с порами большого диаметра (более 4 нм)	Почечные капилляры, альвеолярно-капиллярный барьер, капилляры кожи, мышц	Липофильные и гидрофильные вещества с молекулярной массой до 4000 Д
Пористая мембрана	Гломерулярный аппарат почек	Гидрофильные вещества с молекулярной массой до 50 000 Д

Для большинства токсикантов в крови наблюдается динамическое равновесие между двумя фракциями токсиканта: находящегося в свободном и связанном с белками плазмы или эритроцитами крови состоянии.

Некоторые токсиканты переносятся *элементами крови*, прежде всего эритроцитами и, реже, лейкоцитами. Внешняя поверхность мембраны эритроцитов заряжена отрицательно из-за наличия молекул мукополисахаридов. Положительно заряженные ионы, особенно содержащие четвертичный атом азота, активно взаимодействуют с поверхностью эритроцитов. Токсиканты неорганической природы могут абсорбироваться поверхностью эритроцита (например, мышьяк, цезий, торий, радон, свинец и натрий) либо связываться с лигандами стромы. Попадая внутрь эритроцита, ксенобиотики могут взаимодействовать с гемом (моноксид углерода) или с глобином (^210^Po) и накапливаться в силу этого преимущественно в крови пострадавших. Один и тот же элемент в зависимости от степени окисления ведет себя по-разному: ионы HCr~2~O~7~^– ^и HCrO~4~^– ^связываются исключительно с эритроцитами, а ионы Cr^3+^ неспособны проникать через клеточные мембраны (см. выше). Органические соединения ртути (например, метилртуть) в основном связываются с эритроцитами, а ионы ртути переносятся преимущественно альбумином плазмы. За перенос цинка конкурируют эритроциты, а также специфические и неспецифические белки-переносчики (см. гл. 7). Газы и пары могут растворяться в плазме.

Большинство токсикантов переносятся *белками плазмы*. Плазма крови человека содержит около 75 мг / мл белка и представлена альбуминами (35–55 мг / мл), глобулинами (иммуноглобулинами), белками свертывающей системы крови, белками системы комплемента, ингибиторами протеолиза, липо- и гликопротеинами (0,9 мг / мл). Белки плазмы имеют общую поверхность площадью 600–800 км^2^, способную абсорбировать токсиканты.

Альбумин обладает уникальной способностью связывать многие низкомолекулярные токсиканты. Молекулярная масса альбумина около 66 000 Д. Его молекула, содержащая 585 остатков аминокислот (третичная структура поддерживается 17 дисульфидными связями) при pH 7,4 находится преимущественно в анионной форме. Молекулы

альбумина содержат около 109 катионных и 120 анионных участков для связывания ионов. Альбумин переносит, например, ионизированные формы таких соединений, как динитро- и орто-креозолы, нитро- и галогенопроизводные ароматических углеводородов, барбитураты, витамин С, гистамин и многих других соединений разных классов. Большинство попавших в кровь веществ фиксируется на альбуминах независимо от того, являются они нейтральными, кислыми или основными соединениями.

В молекуле альбумина человека выделяют несколько связывающих участков (их число точно не установлено, предполагают, что их больше шести). Центры связывания (табл. 3-8) отличаются друг от друга сродством к веществам с различными p*K~a~*, механизмами взаимодействия с токсикантами, константами устойчивости (нестойкости) комплекса белок — токсикант. Вещества, связывающиеся с одним и тем же участком, могут конкурентно (согласно закону действующих масс) вытеснять другие, что приводит к изменению их концентрации в плазме крови и продолжительности действия (например, антикоагулянты и сульфаниламиды).

Таблица 3-8. Основные связывающие участки альбумина плазмы крови

Участок	Вещества
Участок, связывающий высшие жирные кислоты	Высшие жирные кислоты нерастворимы в плазме крови при физиологическом значении pH (7,4). Жирные кислоты ослабляют связывание с альбуминами гликозидов, бензодиазепинов и некоторых других веществ. Связывание жирных кислот с альбумином стабилизирует его структуру
Билирубинсвязывающий участок	Билирубин, образующийся при разрушении гемоглобина (непрямой), не растворяется в воде. Его связывание с альбумином изменяет конформацию последнего и, как следствие, сродство к другим транспортируемым молекулам. Многие токсиканты конкурентно вытесняют из альбумина билирубин, что приводит к увеличению его концентрации в плазме крови и сопровождается интоксикацией
Варфарин-связывающий участок	Многие низкомолекулярные соединения. Связывающая способность стереоспецифична
Индолилсвязывающий участок	Бензодиазепины, L-тироксин, триптофан, пенициллины и другие соединения. Бензодиазепины конкуретно вытесняют ряд других токсикантов, а также триптофан, повышая их концентрацию в плазме крови

Достаточно часто встречается гипоальбуминемия, что нарушает или изменяет транспорт токсикантов.

Молекулы α~1~-, α~2~-, β~1~-, β~2~-, γ-глобулина переносят малые молекулы ксенобиотиков (витамины А, В~12,~ D, Е, К, стероидные гормоны и др.), ионы некоторых металлов (медь, цинк, железо) и коллоидные частицы. Липопротеины плазмы переносят липофильные токсиканты, такие как полихлорированные дифенилы (см. гл. 9). Гликопротеины связывают молекулы, обладающие свойствами слабых оснований. Другие белки плазмы — трансферрин, металлотионин, церулоплазмин конкурируют с органическими кислотами за перенос катионов, образуя прочные специфические комплексы (см. гл. 7).

Органические кислоты (молочная, глутаминовая, лимонная) образуют комплексы с некоторыми токсикантами (например, катионами щелочно- и редкоземельных элементов), имеющими высокую степень диффузии и легко распределяющиеся в тканях и органах.

В зависимости от степени сосудистой (кровяной) перфузии организм человека можно разделить на следующие компартменты в нисходящем порядке:

* внутренние органы, включая мозг (75% общего объема крови); * кожа и мышцы; * жировые ткани; * соединительные ткани и кости (около 1% общего объема крови).

Хорошо перфузируемые внутренние органы обычно получают наивысшую концентрацию токсикантов за короткое время. Поступление токсикантов в ткани с пониженной перфузией происходит гораздо медленнее, однако степень их удерживания выше и период пребывания (аккумуляция) более продолжительный (табл. 3-9).

Таблица 3-9. Особенности кровоснабжения различных органов

Органы	Масса органа, %	Кровоток, мл / мин	Площадь капиллярного русла, см^2^ / г
Почки	0,3	4500	350
Легкие	1	5000	250
Мозг	2	550	240
Печень	2	750	250
Мышцы	43	40	70

Важнейшую роль в *межклеточном распределении* токсикантов играет содержание влаги, липидов и белков в клетках различных тканей и органов. Гидрофильные токсиканты более активно распределяются в жидкостях и клетках организма с высоким содержанием влаги, а липофильные токсиканты — в клетках с повышенным содержанием липидов (жировые ткани). Токсиканты из крови попадают в органы, богато снабжаемые кровью, а затем они перераспределяются в соответствии с другими свойствами тканей, например, наличием специальных механизмов захвата веществ, высоким содержанием структур, связывающих ксенобиотик, или соотношением жира и воды в органе или ткани. Конечное распределение токсикантов органической природы, длительно сохраняющихся в организме, не зависит от особенностей кровоснабжения органов.

Молекулы высокомолекулярных водорастворимых веществ белковой природы (например, токсинов, см. гл. 10), циркулирующие в крови, не диффундируют в ткани, если их размер превышает диаметр пор стенки капилляров. Такое же исключительно внутрисосудистое распределение характерно для комплексов низкомолекулярных веществ с белками плазмы крови. Процесс комплексообразования токсиканта с белком подчиняется глобальному закону химии — закону действующих масс. Поэтому по мере диффузии несвязанных молекул токсиканта происходит диссоциация белковых комплексов до тех пор, пока концентрация свободного токсиканта не достигнет равновесных значений во внутри- и внесосудистом пространстве.

Водорастворимые токсиканты, которые связываются с альбуминами и кислыми гликопротеинами, попадают в клетки лишь через поры клеточных мембран, диаметр которых значительно меньше пор стенок капилляров. На способность веществ проникать через клеточные мембраны влияет величина p*K~a~*. Если изменяется кислотность плазмы крови (при ряде заболеваний наблюдается алкалоз или ацидоз), то меняется соотношение ионизированной и неионизированной форм молекул токсиканта и характер их распределения по тканям и органам.

Среди водорастворимых веществ есть и такие, которые проходят через стенки капилляров, но не проникают внутрь клеток, накапливаясь в экстрацеллюлярном пространстве тканей (сульфаты, тиоцианаты и др.).

Токсиканты, хорошо растворяющиеся в липидах, легко проникают не только через гистогематические барьеры (см. ниже), но и через клеточные мембраны, попадают внутрь клеток и накапливаются в жировой ткани и тканях, богатых липидами (ЦНС). Таковы, например, пестициды, галогенопроизводные алифатических и ароматических углеводородов и др. (см. гл. 7). Некоторые экополлютанты (см. гл. 9) и пестициды (ДДТ) — практически нерастворимые в воде вещества — накапливаются в жирах, концентрация их в крови незначительная, однако при снижении содержания жира в организме такие вещества поступают из депо в кровь и оказывают токсическое действие.

В клетки *экзокринных желез* токсиканты поступают путем диффузии через биологические липидные пористые мембраны. Кислотность секрета желез отличается от кислотности плазмы крови, например, pH слюны и грудного молока ниже pH крови. Для этанола, например, соотношение содержания в грудном молоке и крови больше единицы. Использование секретов экзокринных желез в качестве биологического объекта для ХТА (см. гл. 4) объясняется прямой зависимостью между содержанием токсикантов в крови и секрете желез.

Барьерные функции — это физиологические механизмы, обеспечивающие защиту организма и отдельных его частей от изменений окружающей среды и сохранение необходимого для нормальной жизнедеятельности постоянства состава, физико-химических и биологических свойств внутренней среды (кровь, лимфа, тканевая жидкость). Например, проникновение в ЦНС водорастворимых ионизированных веществ крайне затруднено,

что обусловлено наличием гистогематического барьера между кровью, с одной стороны, и тканью мозга или цереброспинальной жидкостью — с другой.

Внутренние барьеры получили название тканевых, гематопаренхиматозных, сосудисто-тканевых и т.д. Наиболее распространен термин *гистогематический барьер*.

Гистогематический барьер — это совокупность физиологических механизмов, регулирующих обменные процессы между кровью и тканями и тем самым обеспечивающих постоянство состава и физико-химических свойств тканевой жидкости, а также задерживающих переход в нее чужеродных веществ из крови. Особенностью гистогематического барьера является его *избирательная проницаемость*.

Большое значение для жизнедеятельности организма имеют *специализированные барьеры*: гематоэнцефалический (между кровью и ЦНС), гематоофтальмический (между кровью и внутриглазной жидкостью), гематолабиринтный (между кровью и эндолимфой лабиринта), барьер между кровью и половыми железами. К гистогематическим относят также барьеры между кровью и жидкими средами организма — цереброспинальной жидкостью, лимфой, плевральной и синовиальной жидкостью — соответственно гематоликворный, гематолимфатический, гематоплевральный и гематосиновиальный барьеры. Барьерными свойствами, защищающими развивающийся плод, обладает плацента.

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ, *BBB* — blood-brain barrier) — барьер между кровью и мозгом. Капилляры мозга, в отличие от всех других капилляров, имеют значительно меньший эффективный радиус пор. Клетки эпителия в капиллярах плотно прилегают друг к другу. Мозг как центральный орган охраняется особенно тщательно от проникновения большинства соединений. Для питательных веществ (аминокислоты, пурины, глюкоза и т. п.), которые должны попасть в мозг, существуют специальные переносчики через мембраны эпителиальных клеток капилляров.

Токсикокинетические процессы находятся под генетическим контролем. Повышение проницаемости ГЭБ вследствие снижения экспрессии гена *MDR*1, приводящего к уменьшению количества *P*-гликопротеина в эндотелиоцитах ГЭБ у лиц с генотипом *TT*, не наблюдается у лиц с генотипом *CC* (рис. 3-2; см. табл. 3-2). Индивидуальные генетические различия между людьми являются серьезным фактором, который следует учитывать при интерпретации результатов химико-токсикологического анализа. Например, оценивая концентрацию дигоксина в крови при подозрении на интоксикацию сердечными гликозидами, следует иметь в виду, что концентрация дигоксина достоверно выше у пациентов с генотипом *TT* по сравнению с пациентами, имеющими генотипы *CC* и *CT*, и это связано с наличием полиморфного маркера *C*3435*T* гена *MDR*1, экспрессирующего *P*-гликопротеин.

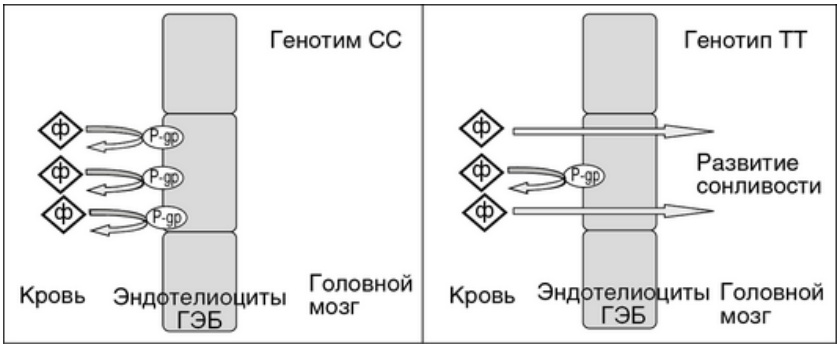


Рис. 3-2. Схема функционирования *P*-гликопротеина в структурах гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) у лиц с генотипами *CC* и *TT*. Ф — фексофенадин; P-gp — *P*-гликопротеин (по Д. А. Сычеву, 2006)

Депонирование — это разновидность распределения токсикантов в организме, при котором происходят их накопление и удерживание в определенном органе или ткани в течение некоторого времени (от нескольких суток до многих лет) при относительно одинаковой концентрации. Депонирование связано с высоким химическим сродством токсиканта к определенным эндолигандам, содержащимся в депонирующей ткани, и/ или высокой липофильностью токсиканта.

Накопление токсиканта в конкретном компартменте обычно имеет временный характер, что связано с различием между скоростью абсорбции и элиминации токсиканта. Нередко накоплению токсиканта в ткани сопутствует его

перераспределение в другие ткани, что часто определяется функциональным состоянием органов, гормональным или микроэлементным балансом, обеспеченностью организма витаминами, приемом лекарственных средств и другими причинами.

Токсиканты, существующие в плазме крови в виде молекул, ионов и коллоидных частиц, можно разделить на несколько групп в соответствии с их преимущественным удерживанием и накоплением в конкретном компартменте (табл. 3-10).

Таблица 3-10. Токсиканты, преимущественно накапливающиеся в конкретном компартменте

Группа токсикантов	Компартменты, накапливающие токсиканты определенной группы
Токсиканты, растворимые в жидкостях организма	Компартменты, содержащие воду. Токсиканты распределяются в них равномерно
Липофильные токсиканты	Содержание липидной фракции в тканях различно. Головной мозг и все ткани ЦНС богаты липидами, склонны к накоплению липофильных токсикантов, что представляет большую опасность из-за непосредственной близости нейротоксикантов (анестетики, органические растворители, тетраэтилсвинец, ртутьорганические соединения и др.) к их мишеням. Токсиканты, удерживаемые в богатой липидами ткани эндокринных желез, вызывают гормональные нарушения. Накопление токсикантов в жировой ткани менее опасно из-за отсутствия мишеней для токсического действия, но при условии сохранения массы жировой ткани
Токсиканты, обладающие высокой степенью остеотропности (например, барий, стронций, радон, бериллий алюминий, кадмий, свинец и др.)	Накопление токсикантов в костной ткани имеет серьезные последствия (см. гл. 7)
Токсиканты, образующие коллоидные частицы (например, лантан, гафний и некоторые трех- и четырехзарядные ионы)	Специальные клетки ретикулоэндотелиальной системы определенных органов и тканей захватывают образуемые коллоидные частицы в зависимости от их размера. В печени удерживаются преимущественно более крупные частицы. Мелкие коллоидные частицы распределяются в селезенке, костном мозге и печени

Итак, липофильные токсиканты, проникнув в энтероциты, могут вновь «выбрасываться» в просвет кишечника *P*-гликопротеином. В энтероцитах, а затем и в гепатоцитах липофильные токсиканты подвергаются биотрансформации до гидрофильных метаболитов, которые либо попадают в системный кровоток, либо активно секретируются в желчь транспортерами органических анионов и катионов. Находясь в гепатоцитах, не успевшие метаболизироваться липофильные лекарственные средства также способны активно секретироваться в желчь с помощью *P*-гликопротеина. Проникновение в ткани липофильных токсикантов затруднено функционированием *P*-гликопротеина эндотелиоцитов кровеносных сосудов. Неметаболизировавшиеся липофильные вещества способны активно секретироваться *P*-гликопротеином проксимальных почечных канальцев в мочу.

Гидрофильные метаболиты токсикантов фильтруются в почечных клубочках или секретируются транспортерами органических анионов и катионов в проксимальных почечных канальцах в мочу. Гидрофильные токсиканты путем простой диффузии транспортируются из сосудистого русла в гепатоциты транспортерами органических анионов и катионов (табл. 3-11).

Таблица 3-11. Характеристика основных транспортеров ксенобиотиков

Транспортер	Локализация	Функция
P-гликопротеин (кодируется геном *MDR*1)	Внешняя поверхность мембраны энтероцитов	«Выкачивание» из энтероцитов в просвет кишечника липофильных токсикантов

	Базолатеральная мембрана гепатоцитов	Активная секреция липофильных ксенобиотиков в желчь
	Базолатеральная мембрана проксимальных почечных канальцев	Активная секреция липофильных ксенобиотиков в мочу
	Внешняя поверхность мембраны эндотелиоцитов, гематоовариального, гематотестикулярного и гематоплацентарного барьеров	«Выкачивание» из эндотелиоцитов в просвет сосуда липофильных ксенобиотиков — предотвращение их проникновения в ЦНС, яичники, яички и через плаценту
OATP-C (полипептид C, транспортирующий органические анионы)	Синусоидальная мембрана гепатоцитов	Поглощение гепатоцитами органических анионов из крови, в том числе билирубина и его глюкуронидов, гормонов щитовидной железы, желчных кислот и их глюкуронированных конъюгатов
OATP-8 (полипептид 8, транспортирующий органические анионы)	Синусоидальная мембрана гепатоцитов	Поглощение гепатоцитами органических анионов из крови
OAT-1 (транспортер 1 органических анионов) и *OAT-3* (транспортер 3 органических анионов)	Базолатеральная мембрана проксимальных почечных канальцев	Активная секреция органических анионов в мочу
OAT-4 (транспортер 4 органических анионов)	Внешняя поверхность мембраны эпителиоцитов проксимальных почечных канальцев	Активная секреция органических анионов в мочу
OCT-1 (транспортер 1 органических катионов)	Базолатеральная мембрана гепатоцитов, эпителиоцитов почечных канальцев	Активная секреция органических катионов в желчь и мочу
MRP2 (multidrug resistance-associated protein, белок множественной лекарственной резистентности)	Каналикулярная мембрана гепатоцитов	Активная секреция органических анионов, в том числе глюкуронидных конъюгатов и конъюгатов с глутатионом в желчь

3.4. Биотрансформация токсикантов

Три пути ведут к знанию:
путь размышления — это путь самый благородный;
путь подражания — это самый легкий путь;
путь опыта — это путь самый горький.

Конфуций (551–479 гг. до н.э.),
великий древнекитайский мыслитель и
философ, основатель базового традиционного
учения Китая — конфуцианства

Биотрансформация — это процесс превращения вещества в форму, удобную для выведения из организма. Биотрансформация токсикантов — сложный многоплановый процесс, в который вовлечено большое количество веществ, находящихся во взаимодействии друг с другом, и на течение которого влияет множество факторов. Биотрансформация, как правило, приводит к снижению активности токсикантов — дезактивации (детоксикации). Однако в некоторых (и не таких редких) случаях метаболиты ксенобиотиков становятся, наоборот, более токсичными соединениями (процесс токсикации), а также могут изменить характер токсического действия или инициировать другой токсический процесс (см. гл. 2).

Биотрансформация токсикантов состоит из двух фаз, каждая из которых выполняет свои функции, а в итоге липофильный ксенобиотик превращается в водорастворимую форму, выводимую из организма. Различают две фазы биотрансформации.

Фаза I — модификация молекулы токсиканта, создающая или освобождающая функциональные группы (например, –OH, –NH~2~, –SH и др.) и осуществляемая различными ферментными системами, локализованными в большей степени в клетках печени.

Фаза II — конъюгация, или синтетические реакции токсикантов и/ или их метаболитов с эндогенными веществами, в результате чего образуются конъюгаты — гидрофильные соединения.

Наиболее часто процесс протекает именно в такой последовательности, но природа ряда токсикантов, прежде всего наличие в молекуле ксенобиотика функциональных групп, способных к конъюгации, позволяет миновать фазу I.

Различают *печеночную и внепеченочную биотрансформацию*.

Особенно интенсивно процессы биотрансформации протекают в печени. При прохождении токсикантов *через печень* большинство из них подвергается биотрансформации в паренхиматозных клетках печени, что называют *эффектом первого прохождения* или *пресистемным метаболизмом*.

Метаболиты как фазы I, так и фазы II из печени поступают в кровь, распределяются по органам и тканям, ферментативная активность которых значительно ниже, а также реабсорбируются печенью для последующей экскреции с желчью.

Поскольку почки, легкие, кишечник, селезенка, мышечная ткань, плацента, мозг, кровь содержат ферментные системы обеих фаз биотрансформации, то они, хотя и менее интенсивно, чем печень, но также участвуют в этом процессе. В ряде случаев токсикация ксенобиотиков в метаболически менее активных органах (например, в мозге) приводит к катастрофическим последствиям (см. гл. 6 и 7).

При внепеченочной биотрансформации могут образоваться *отличные от печеночных* метаболиты одного и того же токсиканта.

Метаболиты, поступившие с желчью в кишечник, частично реабсорбируются и вновь поступают в печень (*печеночная рециркуляция*).

Основная часть ферментов, участвующих в биотрансформации, локализована в гладком эндоплазматическом ретикулуме клеток печени. Ферменты, локализованные в цитоплазме, в плазматической мембране, лизосоме или мембране ядра, также участвуют в биотрансформации.

Большинство реакций фазы I и фазы II являются энзиматическим преобразованием молекул токсиканта.

Фаза I биотрансформации

Существуют десятки суперсемейств ферментов, осуществляющих биотрансформацию токсикантов, однако изоферментам цитохрома *P*450 принадлежит ведущая роль. Многие реакции биотрансформации являются НАДФ^+ ^/ НАДФН- или НАД^+ ^/ НАДН-зависимыми реакциями (табл. 3-12).

Таблица 3-12. Ферменты фазы I биотрансформации

Окисление токсикантов			
Оксидазы смешанной функции (микросомальное НАДФ^+^ / НАДФН-зависимое окисление)	Гидропероксидазы	Дегидрогеназы (НАД^+^ / НАДН-зависимое окисление)	Флавопротеинре-дуктазы
Семейство цитохрома *P*450 участвует в следующих процессах окисления:	Сопряженные процессы, протекающие при восстановлении H~2~O~2 ~и его	Алкогольдегидрогеназа (АДГ) — цитозольный фермент, локализующийся	Участвуют в окислении хинонов, нитропроизводных ароматических углеводородов, бипиридинов и других

* гидроксилировании ароматических и алифатических углеводородов; * эпоксидировании двойной связи; * окислении и деалкилировании гетероатомов (O, S, N, Si); * N-гидроксилировании; * дегидрировании; * разрыве сложноэфирной связи с последующим окислением; * окислительном переносе групп	производных (соокисление), часто приводят к токсикации ксенобиотиков (особенно в тканях с низким содержанием цитохрома *P*450). Пероксидаза-простагландин-Н-синтетаза активирует два процесса: образование гидроперекисей жирных кислот (простагландинов) из арахидоновой кислоты с помощью циклооксигеназы и дальнейшее их восстановление до спиртов. При этом окисляются другие субстраты (в том числе ксенобиотики) — соокисление токсикантов. Амины или фенолы окисляются с образованием свободных радикалов — электрофилов, способных к реакции с нуклеотидными основаниями (см. гл. 2 и 7)	в печени (максимальное содержание), почках, легких, слизистой оболочке желудка. Известно несколько видов АДГ 1. Класс I АДГ-изоферментов (α-АДГ, β-АДГ, γ-АДГ) участвует в окислении этанола, других алифатических спиртов с числом атомов углерода <5 (см. гл. 7). 2. Класс II АДГ (π-АДГ) участвует в окислении алифатических и ароматических спиртов. 3. Класс I АДГ (χ- АДГ) участвует в окислении алифатических с длинной углеводородной цепью и ароматических спиртов. 4. Класс I АДГ (μ-АДГ, σ-АДГ) участвует в окислении ретинола Альдегид-дегидрогеназа (АЛДГ) участвует в НАД^+^ / НАДН-зависимом окислении альдегидов до карбоновых кислот (см. гл. 7). АЛДГ имеет также эстеразную активность	токсикантов с образованием супероксидного анион-радикала и других АФК (см. гл. 2, 7, 9) Молибденсодержащие гидроксилазы (ксантиноксидаза, альдегидоксидаза, сульфитоксидаза) — флавопротеины
Флавинсодержащие монооксигеназы*. Окисление гетероатомов (N-, S-, P-) преимущественно в гетероциклах, ариламинах, гидразинах, тиокарбамидах			Моноаминооксидаза с коферментом флавинадениндинуклеотидом локализована в ткани мозга, во внешней мембране митохондрий клеток печени, почек, кишечника и тромбоцитах. Она участвует в дезаминировании дофамина, норадреналина, серотонина, ГАМК с образованием альдегидов (см. гл. 6)
Дигидродиолдегидрогеназа из семейства альдо-кеторедуктаз участвует в окислении полициклических ароматических углеводородов			

Восстановление токсикантов

с участием коферментов НАД^+^ / НАДН, НАДФ^+^ / НАДФН, ФАД / ФАДН~2~

Цитохром *P*450 и НАДФН-хиноноксидоредуктаза, нитрозоредуктазы, нитроредуктазы, азоредуктазы участвуют в восстановлении азо- и нитросоединений под воздействиием кишечной флоры в анаэробных условиях	Глутатионредуктаза, глутатион-S-трансфераза участвуют в восстанавлении дисульфидов глутатионом	Карбонильные редуктазы и АДГ катализируют восстановление ряда альдегидов и кетонов	Дегалогеназы контролируют восстановительное дегалогенирование алифатических и ароматических углеводородов

Гидролитические реакции

В тканях и жидкостях организма содержатся низкоспецифичные эстеразы, гидролизующие эфиры токсикантов разного строения с изменением их биологической активности

Карбоксилэстеразы, арилдиалкилфосфатаза участвуют в расщеплении эфирной и амидной связей в молекулах токсикантов, производных карбоновых кислот (эфиров, тиоэфиров, амидов, ангидридов, хлорангидридов)	АХ- и псевдохолин-эстеразы (см. гл. 7)	Эпоксидгидролаза катализирует превращение эпоксидов (например, ПАУ, см. гл. 9) в *транс*-дигидродиолы (без участия кофакторов), являющиеся субстратом цитохрома Р450	Флюорогидролаза активирует отщепление от атома фосфора в высокотоксичных ФОС фторид-иона, что резко снижает токсичность ксенобиотика. Соли ртути и меди значительно снижают активность фермента

* Ряд реакций могут катализироваться и цитохромом *P*450.

П р и м е ч а н и е. АФК — активные формы кислорода; ГАМК — гамма-аминомасляная кислота; ПАУ — полициклические ароматические углеводороды; ФОС — фосфорорганические соединения.

Цитохром P450. Гетерогенный фермент цитохром *P*450 (*P450*) локализован в эндоплазматическом ретикулуме клеток печени, незначительные количества фермента обнаружены в легких, почках и мозге (см. п. 2.3). Его суперсемейство обозначают *CYP*, помечая отдельных представителей буквами и цифрами (например, *CYP*2*C*9).

Цитохром *P*450 — фосфолипидопротогемсульфид-протеиновый комплекс, имеющий в восстановленной форме сродство к оксиду углерода(II), — получил такое название вследствие образования с CO прочного комплекса с максимумом поглощения при 450 нм. Цитохромы *P*450 относят к группе гемопротеинов.

Для генов, кодирующих Р450, характерен значительный полиморфизм (табл. 3-13).

Таблица 3-13. Изоферменты *P*450, их субстраты, ингибиторы и индукторы

Изофермент	**Локализация**	**Лекарственные средства**		
		Субстраты	**Ингибиторы**	**Индукторы**
*CYP*I*A*2	Микросомы гепатоцитов	Теофиллин, кофеин	Фторохинолоны, циметидин	Рифампицин, фенобарбитал
*CYP*2*C*9	Микросомы гепатоцитов	НПВС, непрямые антикоагулянты, антагонисты ангиотензиновых рецепторов, пероральные гипогликемические средства	Циметидин, сульфаниламиды	Рифампицин, фенобарбитал
*CYP*2*C*19	Микросомы гепатоцитов	Ингибиторы протонного насоса, антиконвульсанты	Циметидин, хлорамфеникол	Рифампицин, фенобарбитал, карбамазепин
*CYP*2*D*6	Микросомы гепатоцитов	β-Адреноблокаторы, антидепрессанты, нейролептики	Пароксетин, флуоксетин, сертралин, амиодарон, целекоксиб, циметидин	–
*CYP*2*E*1	Микросомы гепатоцитов	Этанол, парацетамол	Дисульфирам, ритонавир	Этанол, изониазид
*CYP*3*A*4	Микросомы гепатоцитов и энтероцитов	Блокаторы медленных кальциевых каналов, статины, местные анестетики, оральные контрацептивы, антигистаминные средства	Макролиды, противогрибковые средства — производные азолов, циметидин, сок грейпфрута	Рифампицин, карбамазепин, глюкокортикостероиды, зверобой, фенобарбитал

Примечание. НПВС — нестероидные противовоспалительные средства.

В отечественной и зарубежной литературе собран огромный экспериментальный и клинический материал о содержании и активности отдельных ферментов *P*450, зависящих от генетических, экологических факторов,

наличия в организме ингибиторов или индукторов фермента, например лекарственных средств (табл. 3-14).

Таблица 3-14. Факторы, влияющие на активность цитохромов Р450

Изофермент	Полиморфизм генов, кодирующих Р450	Пол	Возраст / активность фермента
*CYP*1*A*2*	Носительство медленных аллельных вариантов гена *CYP*1*A*2 замедляет биотрансформацию теофиллина	У мужчин активность выше	К 1-му году жизни составляет 50% активности взрослых. У пожилых снижается более чем на 30%
*CYP*2*C*9	Носительство медленных аллельных вариантов гена *CYP2C9* замедляет биотрансформацию непрямых антикоагулянтов, НПВС, гипогликемических лекарственных средств	Нет различий	К 1-му месяцу жизни сравнима с активностью взрослых. У пожилых снижается более чем на 25%
CYP2C19	Носительство медленных аллельных вариантов гена *CYP*2*C*19 замедляет биотрансформацию ингибиторов протонного насоса, увеличивает эффективность микробной эрадикации	Нет различий	Нет данных
*CYP*2*D*6**	Носительство медленных аллельных вариантов гена *CYP*2*D*6 замедляет биотрансформацию β-адреноблокаторов, антидепрессантов, нейролептиков	Нет различий	Через несколько дней после рождения сравнима с активностью взрослых
	Носительство быстрых аллельных вариантов гена *CYP*2*D*6 ускоряет биотрансформацию β-адреноблокаторов, антидепрессантов, нейролептиков	Нет различий	У пожилых снижается более чем на 45%
*CYP*3*A*4**	Нет данных	У женщин активность выше	К 1-му году жизни — 30–40% активности взрослых. У пожилых снижается более чем на 35%

* При беременности активность снижается.

** При беременности активность повышается.

Реакции токсикации

1. Образование более токсичных метаболитов в процессе фазы I биотрансформации:

* образование ареноксидов, способных вызывать некроз клеток и являющихся канцерогенами; * образование устойчивых эпоксидов; * образование алифатических и алициклических соединений, содержащих в молекуле π-связи; * образование продуктов окисления при разрыве тиоэфирных связей.

2. Образование высокоактивных свободных радикалов токсикантов. Гипотетически многие свободные радикалы должны проявлять канцерогенность. Однако это положение можно считать доказанным лишь для ограниченного числа веществ.

Реакции токсикации приведены в главах 6–10 при обсуждении путей метаболизма конкретных токсикантов.

Фаза II биотрансформации — конъюгация

Экзогенные соединения, содержащие функциональные группы (гидрокси-, амино-, карбокси-, эпокси-, галоген) или представляющие собой метаболиты реакций фазы I, подвергаются биосинтетическим реакциям — *реакциям конъюгации,* или *реакциям фазы II*. Биохимическое конъюгирование — это взаимодействие вышеперечисленных субстратов с такими эндогенными соединениями, как глюкуроновая кислота, серная кислота, аминокислоты, глутатион и др. Как правило, продукты конъюгации более полярны, менее липидорастворимы, быстрее выводятся из организма и менее токсичны.

Реакции конъюгации делят на два типа в зависимости от того, какой объект реакции (субстрат или реагент) активирован.

Первый тип — реакции, протекающие при участии активированных форм присоединяемых агентов (образование гликозидов, сульфатов, метилатов и ацетилатов).

Второй тип — реакции, протекающие при участии активированных форм токсикантов (конъюгация с глутатионом или аминокислотами).

Важнейшие внутриклеточные системы конъюгации приведены в табл. 3-15.

Таблица 3-15. Тип и локализация реакций конъюгации

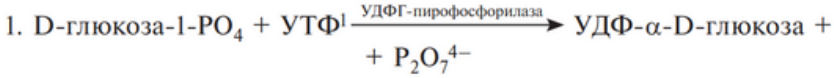
Тип конъюгации	**Внутриклеточная локализация реакции конъюгации**	**Донор макроэргических связей**
Глюкуронидная	Эндоплазматическая сеть	УДФГК
Сульфатная	Цитозоль	АФФС
Метилирование	Цитозоль и эндоплазматическая сеть	S-аденозилметионин
Ацетилирование	Цитозоль	Ацетилкоэнзим А (*A-CoA*)
Глутатионовая	Цитозоль и эндоплазматическая сеть	Коэнзим А (*CoA*)
Конъюгация с аминокислотами	Митохондрии, эндоплазматическая сеть	Коэнзим А (*CoA*)

Примечание. УДФГК — уридиндифосфатглюкуроновая кислота; АФФС — аденозин-3'-фосфат-5'-фосфосульфат.

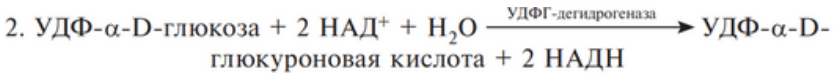
Первый тип конъюгации

Глюкозидная конъюгация

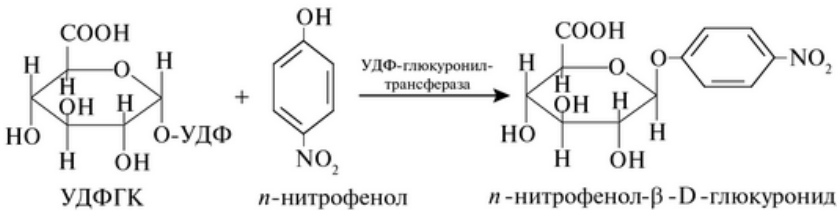
Глюкозидная конъюгация проходит в три стадии. На первой стадии образуется активированный промежуточный продукт — уридиндифосфатглюкоза (УДФГ), на второй — уридиндифосфатглюкуроновая кислота (УДФГК).



УТФ — уридинтрифосфат.



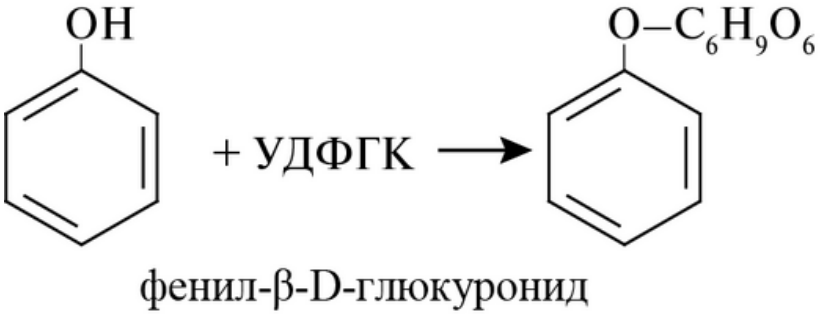
На третьей стадии активный промежуточный продукт УДФГК взаимодействует с агликоном (субстратом):



Реакция третьей стадии является результатом нуклеофильного замещения (S~N~2) в функциональной группе субстрата с Вальденовским обращением.

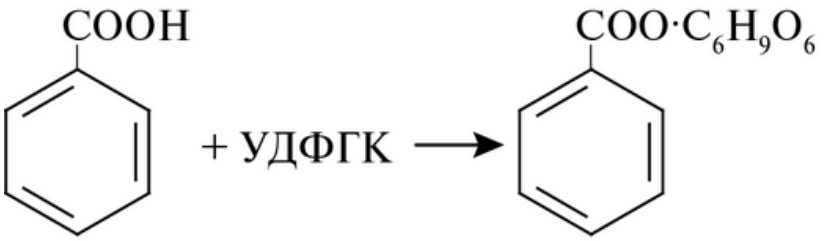
Образование О-глюкуронидов. Возможно образование нескольких типов О-глюкуронидов.

1. Тип простого эфира (субстраты являются первичными, вторичными и третичными спиртами или фенолами), например:



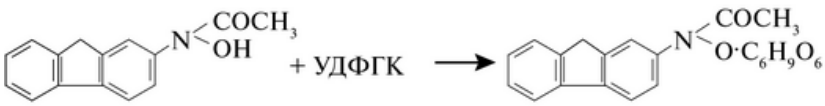
фенил-β-D-глюкуронид

2. Тип сложного эфира (субстраты являются карбоновыми кислотами)



бензоил-β-D-глюкуронид

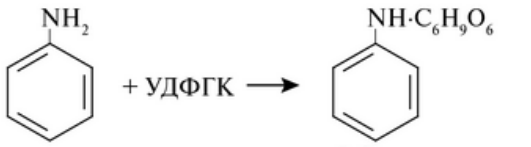
3. Тип гидроксиламина (субстраты содержат фрагмент гидроксиламина)



N-гидрокси-2-ацетил-аминофлуорен N-гидрокси-2-ацетиламинофлуорен-β-D-глюкуронид

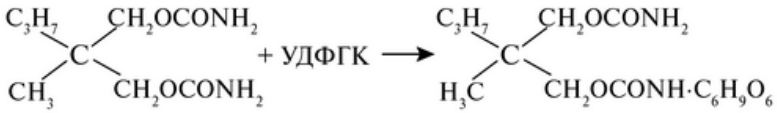
Образование N-глюкуронидов. Образование N-глюкуронидов возможно при конъюгации токсикантов, имеющих ароматические аминогруппы, сульфаниламидную группу, гетероциклический азот, карбамильную группу.

а)



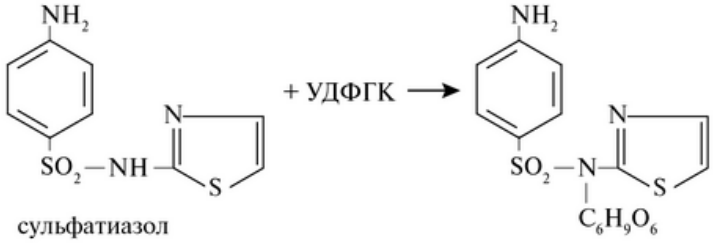
анилин анилин-β-D-глюкуронид

б)



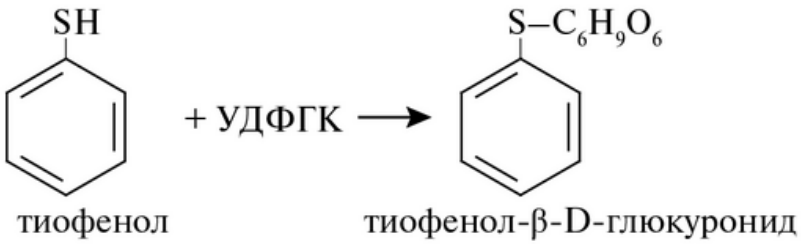
мепробамат

в)



сульфатиазол

Образование S-глюкуронидов. Образование S-глюкуронидов возможно при конъюгации токсикантов, имеющих тиольную группу.

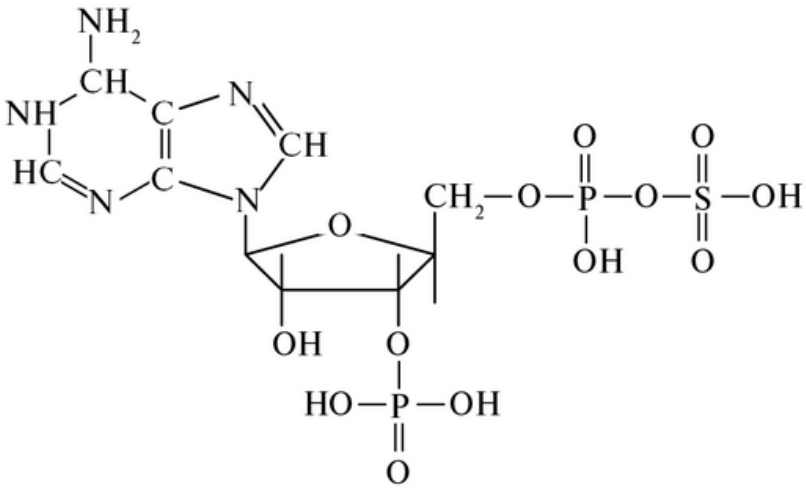


Образование С-глюкуронидов возможно, например, при реакции с фенилбутазоном.

Полярные глюкуронидные конъюгаты выводятся с мочой и желчью траспортными системами для органических анионов (см. табл. 3-11). Однако такие конъюгаты являются субстратами β-глюкуронидаз, присутствующих в кишечной микрофлоре и частично высвобождающих агликон (токсикант или его метаболит). Свободный токсикант или его метаболит подвергается печеночной (или энтерогепатической) рециркуляции, что задерживает его выведение из организма, а также может привести к ошибкам определения содержания токсиканта при ХТА (см. гл. 4, 6–10).

Сульфатная конъюгация

Образование эфиров серной кислоты известно для первичных, вторичных, третичных спиртов, фенолов и ароматических аминов. Конъюгаты с серной кислотой полностью диссоциируют, хорошо растворяются в воде и быстро выводятся из организма. Сульфатирующим агентом является аденозин-3'-фосфат-5'-фосфосульфат (АФФС):



Реакция протекает по схеме:

а) C_6H_5OH + АФФС ⇔ $C_6H_5OSO_3H$ + АДФ
фенол — фенилсульфат

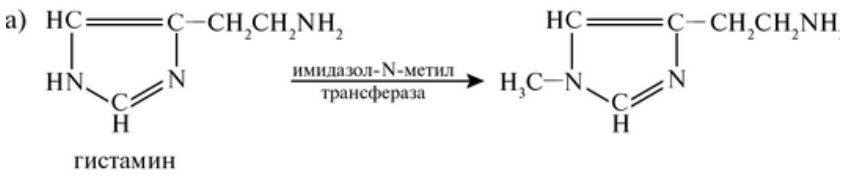
б) C_2H_5OH + АФФС ⇔ $C_2H_5OSO_3H$ + АДФ
этанол — этилсульфат

Сульфатный донор, концентрация которого в клетке в 5 раз ниже, чем УДФГК, синтезируется из неорганического сульфат-иона (источник — цистеин) и АТФ. Сульфатирование снижает токсичность большинства ксенобиотиков за исключением веществ, содержащих ароматическую аминогруппу. Иногда сульфатные конъюгаты служат субстратами для последующих реакций биотрансформации.

Метилирование

Метилирование — реакция, включающая перенос метильной группы от трех важнейших коферментов к аминам, фенолам, тиолам и образование N-, O- и S-метилконъюгатов. Коферменты — 3-аденозилметионин (или S-аденозилметионин — SAM), производные N-метилтетрагидрофолата и витамина B~1~; наиболее важный из них первый.

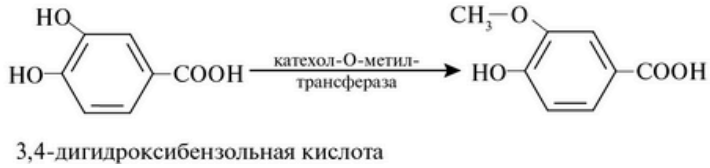
N-метилирование







O-метилирование



S-метилирование. В организме метилируются различные токсиканты неорганической природы, содержащие ртуть, свинец, олово, палладий, таллий, золото, мышьяк, селен, теллур. Коферментами реакции являются S-аденозилметион и витамин B~12~. У метилатов низкая растворимость в воде.

Ацетилирование

Экзогенные амины ацетилируются ацетил-коэнзимом А (*A-CoA*) по схеме:

$$\underset{\textit{A-CoA}}{CH_3COSCoA} + H_2NR \rightarrow RNHCOCH_3 + \underset{\textit{CoA}}{CoASH}$$

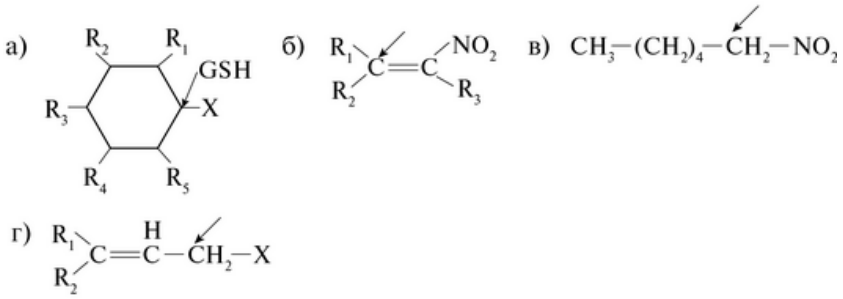
Реакция приводит к образованию плохо растворимых в воде соединений (труднее выводимых), однако менее токсичных. Например, ацетилирование токсичного лекарственного препарата изониазида, снижающего его способность к комплексообразованию с ионами металлов, облегчает его выведение через почки.

Второй тип конъюгации

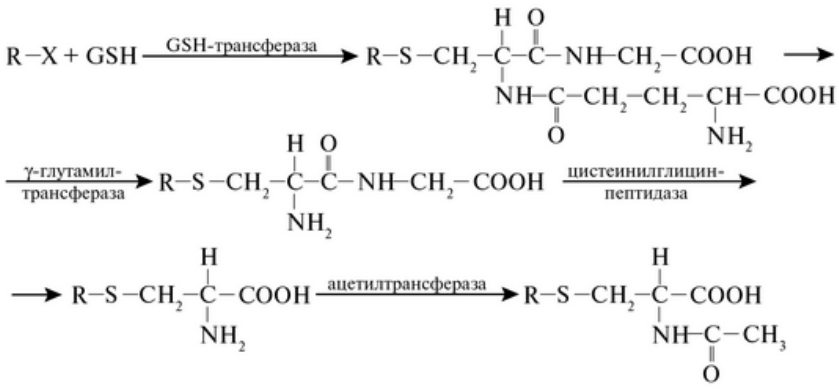
Глутатионовая конъюгация

Известно более 40 различных типов химических соединений, способных образовывать глутатионовые конъюгаты. Всех их объединяет наличие электрофильного центра, способного реагировать с SH-группой глутатиона.

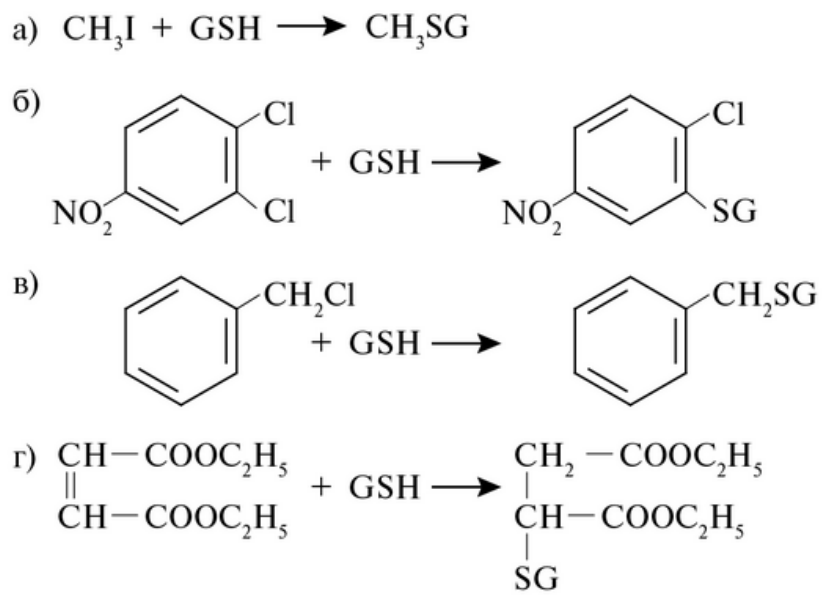
Субстраты:



Конъюгация:



Трипептид глутатион содержит аминокислоты глицин, цистеин и глутаминовую кислоту. Общая схема конъюгации ксенобиотиков, имеющих электрофильные центры, с глутатионом представляет собой перенос остатка глутаминовой кислоты, отщепление глицина и ацетилирование. Нуклеофильная атака глутатион-тиалат-аниона (*GS*^—^) электрофильного атома токсиканта — основной механизм образования тиоэфиров. Токсикант по своей химической природе реагирует с глутатионом неферментативно. Однако глутатион-S-трансфераза значительно ускоряет процесс за счет депротонирования *GSH в GS*^ — ^. Ряд ксенобиотиков взаимодействует с глутатионом стереоселективно только с участием этого фермента. Реакции конъюгации с глутатионом:



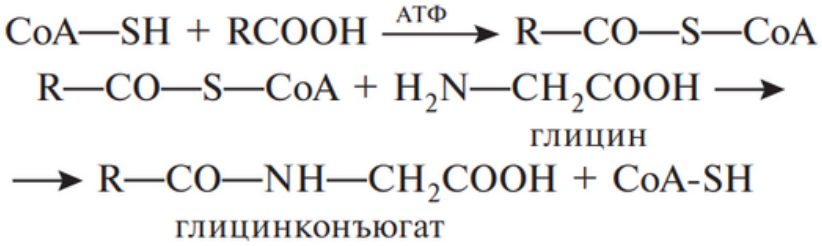
Возможна конъюгация глутатиона с веществами, содержащими гетероатомы O, S, N с последующим образованием окисленного глутатиона *GSSG* (см. гл. 2, 6, 7).

Конъюгаты глутатиона в почках превращаются в меркаптуровые кислоты (см. гл. 7) и выделяются с мочой. В неизмененном виде экскретируются с желчью.

Конъюгирование с аминокислотами

Реакция экзогенных соединений, содержащих карбоксильную группу, с *CoA* в присутствии АТФ приводит к получению производных ацил-*S*-*CoA*, которые затем ацилируют α-аминогруппу аминокислот с образованием

конъюгата:



Большую роль в определении характера реакции конъюгации с аминокислотами играет химическая структура ксенобиотика. Так, ароматические кислоты образуют конъюгаты с глицином, арилуксусные кислоты — с глутаминовой кислотой. Косубстратом может быть и таурин — серосодержащая аминокислота, которая способствует нормализации метаболизма витамина А. Таурин содержится в тканях мышц, сердца, сетчатой оболочки глаза, ЦНС.

Токсиканты, содержащие фрагмент ароматического гидроксиламина, образуют конъюгаты с серином или пролином (см. гл. 7).

Энзимы кишечной флоры

Метаболиты фазы II биотрансформации, поступая с желчью в кишечник, могут под действием бактериальных энзимов (гидролаз) гидролизоваться с образованием исходных неконъюгированных агликонов, которые **подвергаются реосорбции**.

Нитроароматические соединения, например, 2,6-динитротолуол, в анаэробной среде кишечника под действием бактериальных глюкуронидазы и нитроредуктазы могут восстанавливаться до аминов, которые, поступая в печень, вновь подвергаются биотрансформации.

Токсиканты могут быть субстратами, ингибиторами или индукторами ферментов, участвующих в реакциях биотрансформации. Нередко один и тот же токсикант можно отнести к нескольким из указанных категорий. В табл. 3-16 приведена краткая характеристика индукторов и ингибиторов ферментов, влияющих на метаболизм токсикантов.

Таблица 3-16. Характеристика индукторов и ингибиторов ферментов, влияющих на метаболизм токсикантов

Индукторы ферментов		**Ингибиторы ферментов**
Общие признаки: высокая липофильность; активное взаимодействие с ферментами; длительный период полувыведения *t*~1 / 2~. Самый сильный из известных индукторов монооксигеназ — 2,3,7,8-тетрахлородибензо-р-диоксин (ТХДД), эффективная доза 1 мкг / кг. Известно более 250 подобных веществ: барбитураты; полициклические и хлорированные углеводороды; дифенилы; андрогенные и анаболические стероиды; глюкокортикоиды; кетоны и др. Их делят на три группы:		Метирапон, 7,8-бензофлавон, кобальт, *SKF*-525 и др. 1. Обратимые ингибиторы прямого действия: эфиры, спирты, лактоны, изоцианаты, фенолы, антиоксиданты, производные пиридина. 2. Обратимые ингибиторы непрямого действия: производные бензола, арил-алкиламины, алкиламины, ароматические амины, гидразин. Оказывают влияние через промежуточные продукты своего метаболизма. 3. Необратимые ингибиторы, разрушающие цитохром *P*450: полигалогенированные алканы, производные олефинов, производные ацетилена, серосодержащие соединения. 4. Ингибиторы, тормозящие синтез и ускоряющие распад цитохрома *P*450:
1. Индукторы широкого спектра действия (барбитураты, хлоруглеводороды):	2. Индукторы узкого (избирательного) спектра действия, например полициклические	

* ускоряют метаболизм липидорастворимых веществ; * увеличивают содержание цитохрома P450; * увеличивают активность НАДФН; * стимулируют процессы окисления, восстановления и реакции глюкуронидной конъюгации	ароматические углеводороды, стимулируют: * ароматическое гдроксилирование; * N-гидроксилирование; * глюкуронидную конъюгацию	ионы металлов, органические соединения, влияющие на синтез гема, ингибиторы белкового синтеза, металлоорганические соединения свинца, кадмия, ртути

3. Индукторы смешанного типа: полихлорированные дифенилы

Прогнозирование метаболических путей ксенобиотика

Зная общие закономерности метаболических превращений и химическую структуру токсиканта, можно прогнозировать образование его метаболитов. При этом следует иметь в виду следующее.

* Реально реакция протекает преимущественно по какому-либо одному варианту и образуется важнейший метаболит. При этом параллельно протекают и последовательно осуществляются другие пути биотрансформации, но концентрация этих метаболитов будет значительно ниже концентрации основного метаболита. * Биотрансформация токсиканта и количество его метаболитов во многом зависят от скорости выведения вещества из организма. Если скорость выведения вещества высокая, то токсикант будет выводиться или в неизмененном виде, или в виде своего главного метаболита. * При прогнозировании метаболических путей ксенобиотика необходимо учитывать путь его введения и локализацию трансформирующих реакций. Так, оральное введение предусматривает поглощение из ЖКТ, где вещество может быть подвергнуто частичной биотрансфрмации кишечной флорой, пищеварительными ферментами и т.д. Из ЖКТ вещество поступает прежде всего в печень, где (как правило) и образуются основные метаболиты. Если метаболиты — водорастворимые вещества, то они быстро выводятся, не успевая подвергнуться другим превращениям. Соединения, сохранившие достаточную липофильность, возвращаются в кровоток и поэтому включаются в последующие пути метаболического превращения. Вещества, поступившие в организм не из пищеварительного тракта, попадают в артериальный кровоток, достигают места своего действия и только затем могут попасть в печень, частично трансформированные в других органах и тканях, где и произойдут основные реакции метаболического превращения.

3.5. Выведение токсикантов

Во всем мне хочется дойти до самой сути…
… … …
До оснований, до корней, до сердцевины…

Борис Леонидович Пастернак (1890–1960),
выдающийся русский и советский поэт, писатель,
переводчик, один из крупнейших русских поэтов XX века,
лауреат Нобелевской премии по литературе (1958)

Экскреция — это выведение токсиканта и/ или его метаболитов из организма во внешнюю среду без дальнейшего изменения их химической структуры.

Элиминация включает процессы, приводящие к снижению содержания чужеродного вещества в организме, т. е. биотрансформацию, депонирование и экскрецию. Основные количественные характеристики элиминации устанавливают по графику зависимости концентрации вещества в крови (*C*) от времени, прошедшего после приема этого вещества (*t*). Мерой скорости элиминации вещества является величина угла наклона касательной к кривой, проведенной в интересующей исследователя точке. Скорость элиминации уменьшается с течением времени, поскольку уменьшается величина *C*. Однако неизменной характеристикой процесса остается коэффициент пропорциональности *кэл*, или **константа элиминации.** Скорость выведения токсиканта характеризуется *периодом полувыведения t*~1 / 2~ (или *T*~1 / 2~). **Период полувыведения** — это время, за которое концентрация вещества в плазме крови снижается на 50%. Поэтому из формулы *C* = *C*~0~ · *e*^ –^^*кэлt*^ при *t* = *t*~1 / 2~ следует, что *C* = *C*~0~ / 2.

C~0~ / 2 = *C*~0~ · *e*^ –*кэл*·*t*^^1 / 2^, *t*~1 / 2~ = ln2 / *кэл* = 0,693 / *кэл*.

Период полувыведения измеряется чаще всего в часах. Одновременное введение нескольких токсикантов может увеличивать или уменьшать скорость выведения каждого из них. Период полувыведения зависит и от pH мочи.

Клиренс *(*Cl*)* вещества определяется условным объемом плазмы крови (в литрах, миллилитрах), из которого вещество полностью удаляется за единицу времени (секунды, часы). Единицы измерения клиренса — л / с, л / мин, л / ч, а при расчете на единицу массы тела — л / (кг·с), л / (кг·мин) л / (кг·ч). Клиренс — величина, характеризующая индивидуальное вещество.

Общий клиренс (*Cl~tot~*) объединяет все процессы, участвующие в элиминации.

Клиренс рассчитывается путем деления величины введенной дозы на величину площади под кривой зависимости концентрации вещества в плазме крови от времени, прошедшего после его введения. Следовательно, *чем меньше Cl, тем медленнее вещество выводится из организма.* Можно рассчитать отдельно почечный клиренс, клиренс желчью или выдыхаемым воздухом с учетом количества вещества, выделяемого через эти органы (табл. 3-17).

Таблица 3-17. Респираторный и метаболитический клиренс некоторых растворителей у человека (по *A. Sato, T. Nakajima*)

	Клиренс			
Растворитель	**Респираторный**		**Метаболитический**	
	л / ч	**%**	**л / ч**	**%**
Бензол	43	36	75	64
Толуол	22	18	100	82
Ксилол	13	4	116	90
Стирол	6	4	157	96
Хлороформ	33	23	108	77
1,2-Дихлорэтан	17	12	130	88
Тетрахлорид углерода	140	93	11	7
Трихлорэтилен	36	25	104	75

Период полувыведения является функцией объема распределения и скорости элиминации:

t~1 / 2 ~= ln2 · *V~d~* / *Cl~tot~*.

Из уравнения следует, что *чем больше объем распределения при одном и том же значении клиренса, тем дольше выводится вещество из организма*. *Увеличение клиренса сокращает период полувыведения*. Соотношение между значениями клиренса, объема распределения и времени полувыведения вещества для однокамерной модели выражается формулой

Cl~tot~ = *кэл* · *V~d~* = ln2 · *V~d~* / *t*~1 / 2~.

Выделяют четыре этапа элиминации токсикантов:

* фаза 0 — препятствие всасыванию токсикантов в кишечнике, осуществляемое P-гликопротеином и белком MRP; * фаза I биотрансформации; * фаза II биотрансформации; * фаза III — активная секреция токсикантов и/или их метаболитов в мочу или желчь, осуществляемая P-гликопротеином, транспортерами органических анионов и катионов.

Токсикокинетические параметры конкретных веществ рассматриваются в связи с методами их обнаружения и определения в биологических объектах во второй части книги (см. гл. 6–10).

Токсиканты могут экскретироваться через легкие, с потом, слюной и желчью, грудным молоком, но преимущественно выводятся через почки. Ряд токсикантов (например, наркотиков, металлов, экополлютантов)

депонируется в ногти и волосы, где они могут быть определены физико-химическими методами (см. гл. 4, 6–10).

Эндогенные соединения имеют оптимальные механизмы выведения. Эти же механизмы действуют и для выведения токсикантов, близких по строению к эндогенным веществам, однако если ксенобиотики значительно отличаются от них по структуре, то выводятся долго и трудно, претерпевая значительную трансформацию своих молекул, или надолго депонируются в соответствующих тканях, как, например, ДДТ или свинец. Уровень экскреции токсикантов определяется степенью их метаболических превращений в фазах I и II биотрансформации в более полярные и тем самым более легко выводимые соединения, а также генетически детерминированной активностью *P*-гликопротеина, белка *MRP2* и транспортеров органических анионов и катионов (см. табл. 3-11).

Если показатель липофильности нелетучего токсиканта позволяет ответить на вопрос, насколько быстро будет он выведен из организма или не будет экскретирован вовсе, то *величина молекулярной массы нелетучего токсиканта определяет основной путь его выведения*. Соединения с молекулярной массой менее 300 Д выводятся в основном с мочой, а с массой выше 500 Д — главным образом с желчью. Для конъюгированных метаболитов необходимо учитывать увеличение молекулярной массы за счет конъюгированной группы. Так, конъюгация с глюкуроновой, серной кислотами, глицином и глутатионом увеличивает молекулярную массу соответственно на 193, 96, 74 и 306 Д.

Экскреция почками

Почками экскретируется большинство продуктов нормального метаболизма и бóльшая часть полярных токсикантов и гидрофильных метаболитов липофильных веществ. Процесс выведения через почки реализуется посредством трех механизмов:

* фильтрацией через гломерулярно-капиллярный барьер; * секрецией эпителия почечных канальцев; * реабсорбцией клетками эпителия.

Путем фильтрации выделяются все низкомолекулярные вещества, находящиеся в растворенном состоянии в плазме крови. Секреция эпителия почечных канальцев способствует выведению органических катионов и анионов. Реабсорбция включает пассивную обратную диффузию всех жирорастворимых веществ, неионизированных молекул органических кислот, активную реабсорбцию глюкозы, лактата, аминокислот, мочевой кислоты, электролитов. Большое значение имеет pH мочи.

Клубочковая фильтрация. Около 140 мл плазмы крови в 1 мин отфильтровывается через гломерулярно-капиллярный барьер. Размеры молекул токсикантов определяют возможность их прохождения через поры почечных клубочков и присутствия в первичной моче. Вещества, связанные с белками плазмы, не могут проникать через поры. Фильтрат содержит все составные части плазмы крови, имеющие размеры меньше, чем размеры фильтрующих пор базальной мембраны. Скорость фильтрации может меняться в зависимости от ряда факторов, например, увеличиваться при повышении давления крови в гломерулярных капиллярах или уменьшении содержания белка, особенно альбумина, в плазме крови.

У здорового человека белки плазмы крови не подлежат фильтрации, и через почки выделяются лишь вещества, не связанные с белками. В крови согласно закону действующих масс поддерживается равновесная концентрация свободной и связанной с белком форм токсиканта, поэтому как только молекулы несвязанного токсиканта отфильтровываются, равновесие нарушается, что вызывает разрушение комплекса белок–токсикант и высвобождение токсиканта, который опять отфильтровывается через гломерулярно-капиллярный барьер. Некоторые вещества практически полностью отфильтровываются в клубочках почек в течение нескольких часов. Прочно связанные в комплекс с белком токсиканты высвобождаются медленно, поэтому процесс их выделения затягивается.

Уровень выведения большинства токсикантов почками в основном зависит от степени фильтрации в клубочках.

Фильтрация токсиканта в клубочках зависит:

* от введенной дозы токсиканта; * накопления токсиканта (или его метаболитов) в тканях организма; * степени связывания токсиканта (или его метаболитов) с белками плазмы крови; * полярности токсиканта (или его метаболитов).

Большое значение для выведения имеют степень и скорость биотрансформации токсиканта (или его метаболитов).

Неионизированные формы вещества экскретируются клубочковой диффузией (фильтрацией), а ионизированные формы — почечными канальцами.

Канальцевая реабсорбция (выделение и обратное всасывание в почечных канальцах). Суточный объем первичной мочи содержит большое количество веществ, необходимых организму, таких как глюкоза, аминокислоты, соли. До 99% первичной мочи с содержащимися в ней физиологически необходимыми веществами подвергается реабсорбции в почечных канальцах. Это приводит к значительному повышению концентрации растворенных в моче веществ и формированию высокого градиента концентрации между содержимым канальцев и плазмой крови, что является движущей силой обратной диффузии веществ из первичной мочи в кровь.

Реабсорбция ксенобиотиков определяется теми же правилами, которые обусловливают проникновение различных соединений через клеточные мембраны, т. е. липофильные соединения проникают через мембраны легче, чем полярные. Липофильные токсиканты длительнее циркулируют в организме, потому что реабсорбируются в большей степени, а выводятся с мочой в меньшей степени, чем полярные токсиканты.

Выведение ксенобиотиков в почечных канальцах селективное и может быть *активным* или *пассивным.* Активное выведение, осуществляемое транспортерами органических катионов и анионов, характерно для экскреции ионизированных органических оснований и кислот, включая глюкурониды и конъюгированные сульфаты. Слабые электролиты выделяются по пассивному механизму. Эти соединения липофильны в неионизированной форме. Быстро проникая через мембраны стенок канальцев, они попадают в канальцевый проток, где часть их ионизируется при величине pH протока и выводится с мочой, а остальная часть реабсорбируется.

Проницаемость канальцевого барьера сопоставима с проницаемостью слизистой оболочки кишечника, поэтому легко резорбирующиеся вещества при приеме *per os* с трудом выводятся через почки, так как реабсорбируются из первичной мочи обратно в кровоток, а затем вновь из кровотока в первичную мочу. Барьер, образованный эпителием канальцев, межуточным веществом и эндотелием капилляров, оплетающих стенку канальцев, затрудняет свободную диффузию веществ.

Полярные токсиканты, легко растворимые в плазме, отделяются от нее в основном за счет фильтрации в почечных клубочках, концентрируются в канальцах и системой транспортеров выводятся в мочу.

P-гликопротеин и транспортеры органических катионов и анионов участвуют в транспорте молекул токсикантов в мочу.

Выведение печенью

Билиарная экскреция обеспечивает удаление из организма ряда экзогенных и эндогенных веществ, которые не выводятся почками. Желчные кислоты и глутатион являются основными компонентами билиарной секреции. Печень — основной орган биотрансформации токсикантов — выступает и как орган их экскреции в желчь через барьер, образуемый эндотелием печеночных синусов, базальной мембраной и гепатоцитами. Экскреция ксенобиотиков осуществляется путем простой диффузии или активного транспорта. Природа токсиканта — определяющий фактор выбора пути экскреции. *P*-гликопротеин, белок *MRP2* и транспортеры органических катионов и анионов участвуют в активном транспорте молекул токсикантов в желчь: *P*-гликопротеин переносит преимущественно липофильные ароматические соединения с молекулярной массой 300–500 Д и вещества, имеющие аминогруппу, *MRP2* транспортирует конъюгаты с УФДК и глутатионом.

Желчь является важным объектом исследования при проведении ХТА. Для многих токсикантов установлено соотношение между концентрацией ксенобиотика в крови и желчи (см. гл. 4).

Выведение через кишечник

Соединения, выделяемые с желчью, могут подвергнуться реабсорбции в кишечнике. В первую очередь будут реабсорбироваться токсиканты, которые не были метаболизированы в печени. Кишечная экскрекция протекает медленно и является способом выведения токсикантов, не подвергающихся биотрансформации. С фекалиями выделяются вещества, образовавшиеся в результате бактериальной биотрансформации, изменяющей структуру токсиканта. В ряде случаев под воздействием кишечной флоры повышается способность токсиканта к реабсорбции.

Выведение через органы дыхания

Легкими выводятся газы, летучие органические жидкости и летучие метаболиты (вещества, находящиеся при 37 °С в газовой фазе) некоторых нелетучих токсикантов. «Летучий яд», находясь в крови, проникает через альвеолярно-капиллярный барьер по механизму пассивного транспорта и переходит из крови в выдыхаемый воздух. Специфической транспортной системы экскреции, как полагают, в легких нет. Уровень выделения легкими летучих токсикантов будет зависеть от их растворимости в плазме крови, градиента концентрации или парциального давления между средами, а также эффективности легочной вентиляции и величины легочного кровотока. Зависимость между летучестью токсиканта и его растворимостью в крови используется, в частности, при экспертизе алкогольного опьянения по выдыхаемому воздуху (см. гл. 7).

Возможен способ легочной экскреции альвеолярно-бронхиальным путем. В этом случае сурфактант, содержащий токсикант, выделяется в просвет дыхательных путей и выводится вместе с адсорбированными на поверхности эпителия частицами аэрозоля из дыхательных путей благодаря мукоцилиарному восходящему току в гортань, заглатывается и поступает в ЖКТ.

Другие пути выведения токсикантов

Выведение токсикантов может осуществляться секретами экзокринных желез путем простой диффузии (грудное молоко, пот, слезы), что позволяет использовать их в качестве биомаркеров воздействия (см. гл. 1) и объектов исследования при проведении химико-токсикологического анализа (см. гл. 4, 6–10).

Экскреция ксенобиотиков в молоко зависит от продолжительности их нахождения в организме. Липофильные токсиканты с большим периодом полувыведения, например инсектициды, содержатся в молоке в значительных концентрациях. Доказаны экскреция токсикантов (наркотиков, многих лекарственных препаратов, этанола и др.) в грудное молоко матери и возможность отравления младенцев при грудном вскармливании.

Заключение к п. 3.1–3.4

В табл. 3-18 приведены три алгоритма предполагаемого поведения в организме токсиканта органической природы в зависимости от его липофильности и способности к биотрансформации.

Таблица 3-18. Алгоритмы предполагаемого поведения токсиканта органической природы в организме

Гидрофильные вещества	**Липофильные вещества**	
В результате малой способности проникать через липидный барьер мембран гепатоцитов и в связи с этим недоступные для ферментов печени, такие токсиканты практически не подвергаются биотрансформации. Через системный кровоток попадают в почки, где фильтруются в первичную мочу, и, не реабсорбируясь в почечных канальцах, выводятся с мочой	Высокая липофильность. Неспособность к биотрансформации	Средняя липофильность. Способность к биотрансформации
	Легко достигают метаболизирующие токсикант органы и ткани, но в силу своей химической природы не способны трансформироваться в более полярные продукты. Часть веществ, которая подверг-нется гломерулярной фильтрации, будет полностью реабсорбирована из почечных канальцев, так как концентрация свободной фракции этих веществ в плазме крови будет низкой из-за высокого	Продолжительность нахождения в организме способных к биотрансформации веществ определяется скоростью образования их гидрофильных метаболитов. При высокой скорости биотрансформации веществ в печени только их незначительная часть попадет в системный кровоток в неизмененном виде, а оставшаяся часть подвергнется пресистемной элиминации, действие которой может быть настолько эффективным, что вещества (например, нитроглицерин или лидокаин) практически

процента связывания с белками плазмы. На длительное время останутся в организме	не будут оказывать воздействия на организм при принятии *per os*

Реально модель поведения вещества может в большей или меньшей степени измениться под влиянием многих факторов, однако общие закономерности сохранятся.

К факторам, влияющим на биотрансформацию токсикантов, относят естественные факторы (генетические особенности, пол, возраст, питание, вредные привычки, окружающая среда), патологические изменения органов, изменение активности ферментов под влиянием экзогенных веществ**.**

Для оценки и прогнозирования токсического эффекта ксенобиотика иногда используют расчетный способ.

3.6. Вторичный метаболизм

Организм без внешней среды,
поддерживающей его существования, невозможен.

Иван Михайлович Сеченов (1829–1905),
великий русский физиолог,
создатель российской физиологической школы

Посмертные метаболические процессы, или вторичный метаболизм, подразделяют:

* на аэробные (тление, мумификация); * анаэробные (гниение, путрификация).

Тление — аэробный процесс относительно быстрого разложения — приводит к образованию веществ, более токсичных, чем образующиеся при анаэробном процессе — гниении. *Мумификация* сопровождается образованием жировосковых веществ, и в течение длительного времени токсиканты сохраняются в неизмененном состоянии.

В результате вторичного метаболизма претерпевают изменения экзогенные вещества и более 1300 эндогенных соединений. Под действием специфических бактериальных гидролитических ферментов — катепсинов происходит аутолиз — самопереваривание клеток. Через несколько часов после смерти бактерии кишечника проникают через его стенку и по кровеносным сосудам распределяются по всему трупу, при этом кислотность среды и активность катепсинов возрастают, наступает *процесс путрификации* органов и тканей.

Примеры реакций вторичного метаболизма эндогенных соединений:

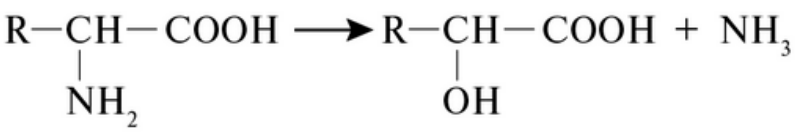
* жиры, аминокислоты → CH~3~OH, C~2~H~5~OH → альдегиды → кислоты * глюкоза → C~3~H~7~OH, C~4~H~9~OH, CH~3~OH → альдегиды → кислоты * лейцин → C~5~H~11~OH→ альдегиды → кислоты * валин → изо-C~4~H~9~OH → альдегиды → кислоты

Химический состав продуктов вторичного метаболизма эндогенных соединений (фона) зависит от времени разложения трупного материала, наличия влаги, доступа воздуха, бактериальной флоры и других факторов.

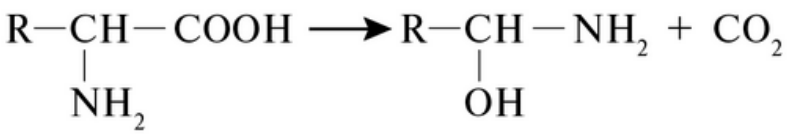
При вторичном метаболизме продолжаются процессы детоксикации ксенобиотиков путем гидроксилирования, метилирования, конъюгации и т.д. Катализаторами этих процессов являются специфические ферменты, образующиеся только после смерти. Особенность вторичного обмена — отделение образовавшихся продуктов от протоплазмы и сохранение (запасание) вне клетки или в метаболически неактивных частях клетки.

При вторичном метаболизме белков идут процессы дезаминирования, декарбоксилирования, биосинтеза.

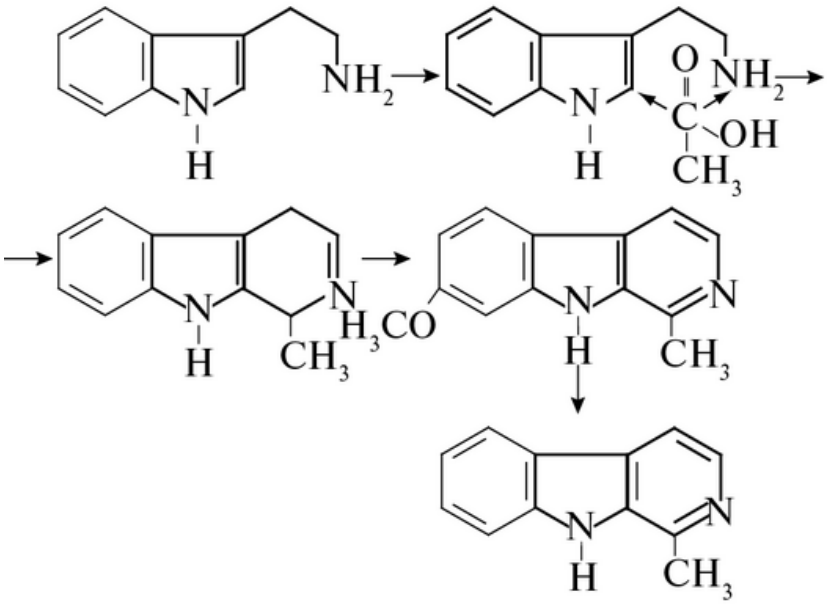
1. Дезаминирование



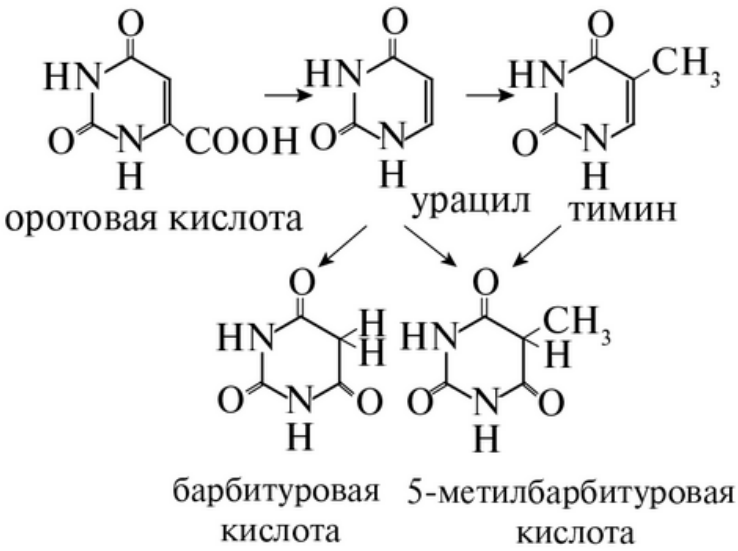
2. Декарбоксилирование



3. Биосинтез, например, из триптамина образуются алкалоиды гармин и гарман



Из оротовой кислоты образуются производные барбитуровой кислоты по схеме:



Реакции трансформации различных азотсодержащих веществ приводят к получению аминов:

–NO~2~ ⟶ –NH~2~

–N=N– ⟶ –NH~2~

≡N–O ⟶ –NH~2~

При проведении 1-го этапа ХТА (скрининг) разложившегося трупного материала *можно получить ложноположительные результаты* за счет содержания большого количества низкомолекулярных соединений, дающих с искомым (подозреваемым) токсикантом идентичные результаты. Поэтому экспертиза загнившего трупного материала требует особых способов пробоподготовки образцов (см. гл. 4).

Основные процессы превращения токсикантов в трупном материале — окисление, восстановление, дезаминирование, декарбоксилирование, десульфирование. Сохраняемость токсикантов в трупном материале различна и зависит от ряда факторов, в первую очередь от природы токсиканта:

* органические вещества разлагаются быстрее, чем неорганические соединения; * органические вещества разлагаются быстрее, чем в живом организме, например, сложные эфиры или амиды в трупном материале практически не обнаруживаются, за исключением кокаина и атропина; * ионы металлов переменной степени окисления восстанавливаются до более низкой степени окисления.

В табл. 3-19 приведены примеры сохраняемости токсикантов в трупном материале.

Таблица 3-19. Сохраняемость токсикантов в трупном материале

Токсикант	Время хранения материала и содержание в нем токсиканта, %	Примечание
Дипразин	3 мес: содержание постоянно снижается	Способ консервирования образцов — добавление этанола. По истечении 3 мес полностью превращается в сульфоксид
Тиоридазин	90 дней: 12–22%	
Амитриптилин	1 мес: 32% 6 мес: 6%	Может быть обнаружен не позднее 6 мес
Этаминал натрия	1 мес: 20–22,7% 6 мес.: 19,8–20,7%	Производные барбитуровой кислоты надежно обнаруживаются в свежем и гнилостно разложившемся материале до 6 мес хранения
Гликозиды дигиталиса	Не более 3 дней	Посмертные процессы в условиях хранения трупного материала при температуре ниже 20 °С существенно не влияют на результат только в первые 2–3 дня с момента наступления смерти
Ртутьорганические соединения	В процессе гниения содержание общей ртути не изменяется, а ртутьорганических соединений — снижается. Через 3 мес: метилртуть ≈ 70% этилртуть ≈ 45% фенилртуть ≈ 20%	Гидролизуются с высвобождением ионов Hg^2+^, которые связываются с меркаптокислотами, серосодержащими пептидами и белками. Хранение в асептических условиях
Хлорофос	3 мес	Распадается с образованием дихлофоса, дихлороацетальдегида. Сохраняемость зависит от первоначальной концентрации: чем больше поступило, тем медленнее распад
Карбофос	1–3 дня	Быстро разлагается в трупном материале
Этанол	—	Динамика содержания этанола во внутренних органах и тканях в разные сроки посмертного периода обусловлена реакцией окисления, диффузией этанола и новообразованием этанола микроорганизмами.
Этанол	Доказано, что этанол сохраняется в течение первых 2 мес при захоронении летом и 4 мес — зимой. Длительность сохраняемости этанола зависит от величины его исходной концентрации. При концентрации более 4‰ обнаружение возможно в течение 3 мес летом.	

Новообразование этанола под действием гнилостной микрофлоры происходит в течение первых 2 мес. Увеличение содержания этанола не превышает в среднем 0,4‰ (в желудке до 1,1‰).
Высокое содержание этанола в органах и тканях, подвергшихся гнилостному изменению в отсутствие специфической микрофлоры (дрожжевые, плесневые бактерии), свидетельствует о прижизненном введении, а не о новообразовании

Глава 4. Методология химико-токсикологического анализа

Но растет там из открытий лес
Над бездонной пропастью ошибок.

Петр Васильевич Кузнецов (род. 1946 г.),
профессор, зав. кафедрой
Кемеровской медицинской академии

Быть сильным хорошо,
Быть умным лучше вдвое.

Иван Андреевич Крылов (1769–1844),
русский публицист, баснописец
(написал и перевел 236 басен), поэт, издатель

4.1. Основные направления, цели и задачи химико-токсикологического анализа

Задача достоверного обнаружения и количественного определения широкого круга веществ различной химической природы в часто кардинально отличающихся друг от друга по своим свойствам и характеристикам объектах может решаться исключительно с привлечением нескольких химических, иммунохимических и физико-химических методов исследования, результаты которых взаимно дополняют и уточняют друг друга.

ХТА — системное аналитическое исследование, целью которого являются идентификация токсикантов и определение их концентрации в анализируемых объектах. Каждое исследование, проведенное судебным химиком-экспертом, имеет *юридические последствия*. Достоверность и надежность полученных результатов определяются правильностью организационных мероприятий (отбор пробы, хранение проб, постоянный контроль над работой оборудования, чистотой реагентов и др.), чувствительностью и специфичностью используемых методов, знанием природы и метаболизма токсиканта.

Различают (условно) несколько направлений (видов) ХТА, каждое из которых имеет свои задачи и некоторые особенности (табл. 4-1).

Таблица 4-1. Основные направления (виды) химико-токсикологического анализа*

Вид анализа	Цель анализа	Задачи анализа	Особенности анализа
Судебно-химический анализ (СХА)	Установление причин смерти или покушения на жизнь. Как составная часть судебно-медицинской экспертизы	Идентификация и количественное определение вещества, вызвавшего отравление. Судебно-правовая оценка отравления	Следует учитывать: * характер биообъектов; * многообразие токсикантов; * различное распределение токсикантов по органам и тканям; * наличие мешающих агентов; * степень разложения трупного материала (вторичный метаболизм)
Клинико-токсикологический анализ (КТА)	Диагностика отравления для выбора метода лечения и дальнейшей реабилитации	Идентификация и количественное определение вещества, вызвавшего отравление	Экспресс-анализ. Установление корреляции между терапевтической и токсической дозой

Анализ наркотических средств (АНС)	Установление факта присутствия наркотических средств в биосубстратах человека, количественное определение токсикантов (согласно законодательству РФ)	Идентификация и количественное определение (не всегда) средства, вызвавшего наркотическое одурманивание	Следует учитывать: * возможность сокрытия факта употребления наркотических средств; * возможность фальсификации пробы; * возможность использования нескольких наркотических или одурманивающих средств одновременно (проявление синергизма и антагонизма токсикантов)
Допинг-анализ	Установление факта присутствия в биосубстратах человека вещества, запрещенного Всемирной антидопинговой организацией (WADA), или свидетельства его использования	Идентификация и количественное определение запрещенного вещества и его метаболитов	Высокая чувствительность методов анализа. Следует учитывать: * возможность сокрытия факта употребления запрещенного средства; * возможность фальсификации пробы; * возможность использования нескольких запрещенных средств одновременно; * многообразие потенциальных допингов; * терапевтическую дозу разрешенных препаратов

* Криминалистический анализ не является предметом рассмотрения этой книги. Особенности анализа объектов небиологического происхождения на наличие наркотиков рассмотрены в гл. 4.6.2.

ХТА имеет судебно-правовую направленность, которая заключается в том, что юридические вопросы решаются аналитическими методами, а полученный результат на конечной стадии преобразуется в юридический ответ.

Существует *три варианта проведения ХТА* в зависимости от конкретных обстоятельств дела, клинических и других ситуаций.

1. Направленный анализ проводится в том случае, когда известны обстоятельства дела. Это анализ объектов, содержащих известные токсичные вещества (может быть известна даже доза попавшего в организм токсиканта). Пример — проведение ХТА в клинических лабораториях для контроля над выведением ксенобиотика, ходом лечения и т.д.

2. Наличие косвенных сведений, указывающих на возможную причину отравления, гипотезы о химической природе токсичного вещества, построенной на основе клинической картины отравления пострадавшего и/ или результатов судебно-медицинского или патологоанатомического исследования трупа, обусловливают некоторые *изменения в методических подходах*, применяемых в направленном ХТА.

3. Ненаправленный анализ проводится в отсутствие каких-либо сведений о природе токсичного вещества и требует принципиально другой стратегии. Это наиболее сложный случай исследования, в котором всегда применяют группы методов анализа, а полученные результаты взаимно дополняют и уточняют друг друга.

Стратегия проведения анализа выстраивается в зависимости от особенностей направленного или ненаправленного исследования.

При проведении *направленного анализа* необходимы:

* подтверждение наличия известного токсиканта в биосубстратах потерпевшего; * определение количественного содержания токсиканта.

На основании знания физико-химических свойств токсичного вещества подбирают условия и технику изолирования, которая позволяет селективно отделить анализируемое вещество от биологической матрицы. В некоторых случаях возможно прямое обнаружение токсиканта в биологическом образце.

Если в первом варианте проведения ХТА для выбора оптимальных условий анализа можно воспользоваться справочной информацией или данными литературы, то второй и третий варианты более сложные. Они требуют многоступенчатой методики изолирования, поскольку необходимо охватить все подозреваемые вещества с самыми разнообразными физико-химическими свойствами.

В случае *ненаправленного анализа* общим методическим подходом является *скрининг* (англ. screening — просеивание, отбор) — обнаружение групповой принадлежности возможно присутствующего токсиканта, основанное на каких-либо общих свойствах веществ данной группы (например, группа бензодиазепинов, группа барбитуратов и др.). Скрининговые тесты, как правило, имеющие невысокую специфичность, позволяют в минимальное время из большого круга токсикантов выявить одно или несколько веществ, для подтверждения обнаружения которых далее проводится целенаправленное исследование (идентификация и количественное определение).

Выбор совокупности аналитических методов исследования определяется главной тактической задачей анализа — добиться минимума отрицательных и максимума положительных результатов при определении токсиканта в биообъектах — и основан на таких характеристиках аналитических методов, как *чувствительность* и *специфичность*. В ХТА принято дальнейший поиск токсиканта не проводить, если получен отрицательный результат. В этом случае в экспертном заключении указывают, что результат имеет о*трицательное судебно-химическое значение.*

Во всех вариантах проведения ХТА аналитик сталкивается с получением *ложноположительных* и *ложноотрицательных* результатов (схема 4-1). Первые связаны с недостаточной селективностью методов обнаружения, а вторые — с их недостаточной чувствительностью.

Положительные результаты =
= истинно положительные (объект, содержащий анализируемое вещество) + ложноположительные (объект, не содержащий анализируемое вещество)

Отрицательные результаты =
= истинно отрицательные (объект, не содержащий анализируемое вещество) + ложноотрицательные (объект, содержащий анализируемое вещество)

Схема 4-1. Формирование положительных и отрицательных результатов

Ложноотрицательный ответ (результат) — это отрицательный ответ на присутствие подозреваемого вещества, полученный при исследовании объекта, *содержащего* это вещество. Количество ложноотрицательных ответов обратно пропорционально чувствительности метода анализа: чем выше чувствительность, тем меньше ложноотрицательных ответов и больше положительных. Получение ложноотрицательных результатов связано не только с недостаточной чувствительностью используемого метода, но и с преднамеренной фальсификацией пробы, недостаточной квалификацией эксперта, систематическими ошибками исследований.

Ложноположительный ответ (результат) — это положительный ответ на присутствие подозреваемого вещества, полученный при анализе объекта, не содержащего это вещество. Ложноположительные результаты указывают на возможное присутствие какого-либо токсиканта, хотя на самом деле его нет, или на присутствие определенного токсиканта, тогда как присутствует другое токсичное вещество. Ложноположительные результаты теста приведут *к дополнительным тестам, но не к ложному заключению*. Ложноположительные результаты (их число может достигать 10–15%) обусловлены недостаточной специфичностью используемого метода за счет перекрестных реакций, слабой профессиональной подготовкой эксперта, систематическими ошибками, загрязненными реагентами, плохой организацией труда, некачественной документацией.

Ложноотрицательные и ложноположительные результаты выявляются, как правило, на ранних стадиях аналитического процесса и рационально решаются.

4.2. Основные этапы химико-токсикологического анализа

Поди туда — не знаю куда, принеси то,
не знаю что…

Русская народная сказка

Выбор стратегии (греч. *strategus*, «искусство полководца» — способ достижения сложных целей, полный план действий при всевозможных ситуациях, способных возникнуть) выполнения ХТА — *важнейшая профессиональная задача эксперта*. Выбранная стратегия определяет действия эксперта в любой момент исследования и для любого возможного развития событий, способного привести к любой ситуации. Как известно, наука стратегия проявляется только в практической деятельности и требует наличия стратега, личность и искусство которого являются важными, порой главными, элементами стратегии. Недаром о проведении экспертных исследований, в частности химико-токсикологических, говорят как об искусстве, в котором стратегия является инструментом, а стратег (эксперт) — творцом.

Основными этапами ХТА являются:

* отбор пробы; * преданалитическая подготовка пробы (перевод пробы в форму, удобную для анализа; разделение и концентрирование, дериватизация пробы и др., см. ниже); * обнаружение, идентификация и количественное определение токсиканта (см. гл. 5–10); * обработка результатов и их интерпретация (см. ниже п. 4.6 и гл. 5–10).

После выяснения и уточнения обстоятельств, приведших к необходимости проведения ХТА, определяют его правовой аспект, вид, цель и задачи.

Далее выбирают *совокупность методов* проведения экспертизы, обеспечивающую надежность полученных результатов, и разрабатывают конкретный план исследования. После отбора аналитических методик проверяют правильность каждого избранного метода (определение систематической ошибки измерений с использованием эталонных растворов веществ сравнения и/ или другими независимыми методами) и оценивают воспроизводимость результатов аналитического исследования (определение случайной ошибки).

Процесс обнаружения и идентификации разделен *на две стадии*: первая — *предварительная* (скрининг), вторая — *подтверждающая*. Методы первой стадии должны обладать высоким уровнем чувствительности, высокой производительностью, достаточно широким охватом классов токсичных соединений, но не обязательно высокой специфичностью. На этой стадии *нужно получить минимум отрицательных ответов и максимум положительных*, однако при таком методологическом подходе число ложноположительных результатов значительно. При использовании даже самого чувствительного предварительного метода результаты скрининга должны быть *подтверждены* аналитическими методами, основанными на других физико-химических принципах.

Вторая стадия — удаление всех (в идеале) ложноположительных результатов. Подтверждающие методы должны быть равными или превосходить по чувствительности предварительные методы для уменьшения числа ложноотрицательных результатов и должны превосходить их по специфичности для снижения числа ложноположительных результатов.

Полученные качественные и количественные результаты должны отличаться особой надежностью, так как имеют *юридические последствия*. Надежность работы химико-токсикологической лаборатории оценивается способностью *достоверно обнаружить* химическое вещество, вызвавшее отравление, и/ или его метаболиты в биожидкостях и тканях потерпевшего, а также в объектах небиологического происхождения, с которыми контактировал человек. Не менее важно *достоверно не обнаружить* такие вещества, если отсутствовало их потребление или контакт с ними.

Надежность полученного ответа во многом зависит от правильной организации получения, приема и хранения объектов исследования (биоматериал, объекты небиологического происхождения), четкого документирования всего процесса работы, постоянного надзора за правильностью работы оборудования и чистотой всех реагентов, профессиональной подготовки кадрового состава лаборатории. Для подтверждения надежности результатов часто возникает необходимость в моделировании аналитического процесса, т. е. проведении эксперимента,

имитирующего влияние окружающей среды, условий хранения, пробоподготовки на химический состав объекта исследования. Если требуется *установить химическое строение* и количественно определить содержание токсиканта, то необходимо воспользоваться *паспортизированными стандартными образцами.* Все этапы ХТА должны быть проконтролированы.

Контроль на стадии отбора пробы проводится в связи с возможным уничтожением вещественного доказательства или фальсификацией объекта, малой по массе пробой, ее загрязнением или изменением химического состава под воздействием окружающей среды.

Контроль на стадии пробоподготовки проводится в связи с риском частичной или даже полной потери определяемых веществ. Эта операция должна состоять из действий, направленных на сохранение определяемого вещества. Рекомендуется проведение экспрессных тестов, не требующих предварительной подготовки, т. е. непосредственно в биоматериале и других объектах (иммунохимические, химические и некоторые другие тесты). Для большинства методов ХТА стадии пробоподготовки и концентрирования являются обязательными.

Контроль на стадии обнаружения, идентификации и количественного определения. Выбор совокупности методов определения токсиканта должен предполагать применение методов, основанных на разных физико-химических принципах. В ХТА первичное обнаружение токсичного вещества принято подтверждать с помощью повторных исследований методами, имеющими отличную от предварительных методов анализа физико-химическую природу. При некоторых обстоятельствах может быть применен метод ГЖХ в качестве предварительного и подтверждающего теста, например, если на второй стадии исследования используется дериватизация (см. ниже) образца (силилирование или ацетилирование), ведущая к изменению аналитического сигнала ГЖХ — времени удерживания, характерного для токсиканта. Однако подтверждающее исследование с использованием метода ГЖХ на колонке, подобной, но не идентичной использованной в предварительном анализе, обычно неприемлемо, так как данные об относительном времени удерживания многих веществ не будут существенно различаться при переходе к близким условиям хроматографирования (от одной системы к другой), например использование фазы OV-1 или OV-17 (см. п. 5.3.2).

Применение радиоиммунного анализа (РИА) для подтверждения положительных результатов, полученных другим иммунохимическим методом, например поляризационным флуоресцентным иммуноанализом (ПФИА), неприемлемо, хотя эти два метода и различаются по своей сущности. Это связано с тем, что вещества, исследуемые первым методом, будут давать те же самые перекрестные реакции, что и при использовании второго метода (специфичные антитела могут реагировать на те же токсичные вещества или на вещества, сходные с ними; см. п. 5.2).

Если сравнивать надежность тонкослойной хроматографии (ТСХ) и иммунных методов при проведении скрининга, то иммунные методы превосходят ТСХ-скрининг в отношении обнаружения токсичных веществ, потребляемых в низких (миллиграммовых и субмиллиграмовых) количествах, например галлюциногенов. В случаях острых отравлений, летальных исходов, когда дозы токсичного вещества повышены из-за передозировки, ТСХ-скрининг является вполне удовлетворительным методом.

Что касается использования ТСХ как подтверждающего метода для иммунохимических тестов и наоборот, то единой точки зрения нет. ТСХ считается *недостаточно надежным* подтверждающим методом при решении *юридических* задач, но *достаточно надежным* для решения *клинических* вопросов. Что касается использования иммунохимических методов (ИХМ) для подтверждения данных ТСХ, необходимо помнить, что в большинстве случаев они подтверждают наличие не индивидуального вещества, а класса веществ, к которому нередко могут относиться соединения, проявляющие разное токсическое действие. Однако в последние годы успехи иммунохимии настолько значительны, что стало возможным определение ряда индивидуальных веществ либо узкой группы аналогов (см. п. 5.2). Повторно использовать иммуноферментный метод с различной перекрестной реактивностью можно для аргументации первичного скрининга, например, за неспецифичным иммуноферментным анализом (ИФА) с широким спектром перекрестных реакций на опиаты следует сделать более специфичный иммунный тест на конъюгированный морфин. Тем не менее комбинирование ИХМ / ТСХ или ИХМ / ГЖХ требует использования еще одного подтверждающего метода, например ГХ-МС.

Подтверждающими методами являются в первую очередь гибридные методы ВЭЖХ-МС, ГХ-МС или капиллярного электрофореза с масс-спектрометрическим детектированием (КЭФ-МС), которые соединяют высокоэффективное разделение веществ, содержащихся в образце, с высокочувствительным масс-селективным детектированием.

Подтверждение идентичности обнаруженного вещества *в нескольких экстрактах одной и той же пробы* является обоснованным и правильным приемом. Подтверждение результата только в единичном экстракте образца не может быть аргументировано, поскольку не исключена возможность загрязнения экстракта в процессе пробоподготовки. Использование подтверждающих методов идентификации рекомендуется в отношении всех видов токсичных веществ, включая этанол и оксид углерода(II).

Метод *количественного* определения содержания искомого вещества может быть одновременно и *подтверждающим* методом идентификации, если определяемое вещество было изначально обнаружено методом, отличающимся по своей природе (например, ПФИА + ГХ-МС).

Внутренний и внешний контроль. Для надежной работы лаборатории важным условием является наличие внутреннего и внешнего контроля над всеми этапами работы от получения объекта исследования до выдачи ответа. Для *внутреннего контроля*, проводимого в самой лаборатории, можно использовать объекты, в которых уже обнаружено то или иное токсичное вещество, и объект, заведомо не содержащий этого вещества. Желательно, чтобы количество токсичного вещества в контрольных объектах было ниже, на уровне и выше порогового уровня чувствительности скринингового метода, применяемого в данной лаборатории. Контрольные образцы должны составлять не менее 10% всех исследуемых проб.

Внешний контроль проводится по специальным программам крупными клиническими, токсикологическими и наркологическими учреждениями и центрами, возглавляющими службу ХТА. Проверка работы лабораторий проводится *открытым способом*, когда лаборатории знают, что они исследуют контрольные пробы, и *скрытым способом*, когда лаборатории не знают, что они исследуют контрольные пробы. Открытый способ проверки способствует выявлению максимальных технико-организационных возможностей лаборатории, скрытый — реализации этих возможностей в рутинном анализе.

Отбор пробы

Эффективность определения содержания токсичного вещества снижается из-за манипулирования (с умыслом или без) с образцом, отбираемым на анализ (особенно у живых лиц). Образец может быть разбавлен, подменен или загрязнен. Имеется широкий выбор информации о том, как замаскировать тест, начиная от устных рекомендаций до ресурсов Интернета и популярных журналов. Кроме того, существует достаточное количество данных по премедикации, в которых показано, какими способами можно создать интерференцию в тестировании, например, наркотиков, для получения ложноотрицательных результатов. Не исключен вариант выпуска подпольными наркосиндикатами готовых форм, заведомо содержащих химические вещества, могущие впоследствии замаскировать употребление запрещенного средства.

В свою очередь, для противостояния возможному манипулированию с образцом лаборатории должны использовать систему организационных мероприятий с целью обеспечения надежности результатов тестирования. Они охватывают все этапы ХТА, включая отбор проб, пробоподготовку, предварительные и подтверждающие методы анализа.

Отбор образцов трупного материала при проведении СХА. Эксперт руководствуется нормативными документами, регламентирующими его работу, и составляет план исследования посмертного материала *при невыясненных обстоятельствах отравления* химическим агентом. Вначале анализируется первичная информация и результаты вскрытия.

Если у патологоанатома судебно-медицинского эксперта нет особых сведений для судебного химика-аналитика, ответственность за решение, какие тесты должны быть проведены, лежит исключительно на профессиональной компетентности специалиста-химика. Каждый биообъект подвергается ненаправленному анализу. Для скрининга широкого спектра веществ большинство эффективных схем проведения экспертизы включает сочетание иммунохимических методов с хроматографическими методами и химическими тестами. В лабораториях судебно-

химических отделений биообразцы анализируются по стандартизированным схемам согласно методическим указаниям, утвержденным соответствующими организациями.

Образцы трупного материала морфологически разнообразны и вариабельны по содержанию токсиканта. Отбор образца основан на анамнезе случая, указаниях органов дознания или доступности изъятия. В качестве исследуемых объектов отбираются кровь (из сердца и периферическая), вся доступная моча и желчь, стекловидное тело, все доступное содержимое желудка и ткани органов, в первую очередь печени (табл. 4-2). При этом выполняются соответствующие инструкции и приказы об отборе максимального количества образца. В случаях когда вскрытие не производили, отбираются периферическая кровь, моча и стекловидное тело.

Выбор биообъекта, его отбор, консервирование и хранение — важнейшие процедуры СХА.

Таблица 4-2. Объекты исследования при проведении судебно-химического анализа

Биообъекты	**Количество образца**	**Примечания**
Кровь	50–100 мл	Источник идентификации. Анализируется всегда. Консервант — 2% раствор фторида натрия или оксалата калия. Хранить при 4 °С в течение тестирования и при –20 °С во время длительного хранения. Если возможно, то хранить аликвоту без добавления консервантов
Кровь периферическая (из бедренной или подключичной вены)	10–20 мл	Источник идентификации. Анализируется при полном химико-токсикологическом исследовании. Консервант — 2% раствор фторида натрия или оксалата калия. Хранить при 4 °С в течение тестирования и при –20 °С во время длительного хранения
Кровь, тромб	10–20 мл	Анализируется в случаях травмы. Консервант — 2% раствор фторида натрия или оксалата кальция. Хранить при 4 °С в течение тестирования и при –20 °С во время длительного хранения
Моча	Вся (но не более 200 мл)	Источник идентификации. Анализируется по мере необходимости. Консервирование необязательно. Выделить некоторое количество, даже если общий объем менее 1 мл, для иммунохимического скрининга
Желчь	Вся или не менее 30 мл	Источник идентификации. Анализируется всегда. Консервирование необязательно. Перевязать желчный пузырь, чтобы избежать загрязнения, отбирать перед отбором образца печени
Стекловидное тело	Всё или не менее 2–3 мл жидкости из каждого глаза у взрослых, около 1 мл у новорожденных	Источник идентификации. Анализируется по мере необходимости. Консервирование необязательно. Собрать жидкость из обоих глаз в обычную пробирку

Содержимое желудка	Всё	Анализируется при полном химико-токсикологическом исследовании. Консервирование необязательно. Перевязать желудок, чтобы избежать загрязнения из других внутренних органов; отметить общий объем
Печень*	50 г	Источник идентификации. Анализируется всегда. Консервирование необязательно
Почки*	100 г	Анализируются на металлы, этиленгликоль. Консервирование необязательно
Селезенка*	50 г	Анализируется на CO, цианид-ионы. Консервирование необязательно. Очень полезное исследование, особенно когда мало крови (обгоревшие трупы)
Мозг, жировые ткани*	50 г	Анализируются на липофильные вещества. Консервирование необязательно. Очень полезное исследование в случаях детской смерти
Легкие*	50 г	Анализируются на летучие яды. Консервирование необязательно. Отбирать в опечатанный контейнер.
Волосы	Связанный пучок с теменной части головы (не всегда)	Анализируются при подозрении на отравление металлами. Консервирование не требуется. Отметить дистальный и проксимальный концы

* При использовании современных методов определения токсичных веществ достаточна проба биоматериала массой 5–15 г.

Судебная защищенность результатов ХТА зависит от качества и типа отобранных образцов, их сохранности и документального оформления, а также контроля во время отбора пробы и процесса хранения.

Консервирование образца (**см. примеры в гл. 6–9**)

До исследования объекты консервируют только при подозрении на отравление сердечными гликозидами. Для этого внутренние органы заливают этанолом-ректификатом до образования уровня жидкости 1 см над их поверхностью. После исследования оставшиеся биологические жидкости и внутренние органы (архивный материал) хранят в морозильных камерах при температуре –18 °С в течение 1 года.

Документирование и маркировка отобранных биообъектов (**см. примеры в гл. 6–9**)

При поступлении в судебно-химическое отделение биологических образцов в соответствии с направлением на исследование от врача-танатолога производится регистрация в журнале учета экспертиз (исследований). В ряде случаев биологический материал может быть направлен непосредственно органами следствия, судом.

Каждый контейнер с отобранным образцом биологического материала должен быть промаркирован и содержать следующую информацию: идентификационный номер, фамилию, имя, отчество потерпевшего, дату смерти (если имеется информация), дату и время отбора образца, подпись танатолога, тип образца, место отбора. Эта информация отражается в акте судебно-химического исследования или заключении эксперта.

Преданалитическая подготовка пробы

Существует два направления скрининга токсичных агентов. Одно из них — *прямое обнаружение* (без изолирования и очистки) в образце специфического агента или класса соединений хромогенными, микрокристаллоскопическими, иммунохимическими и другими методами. Другой путь — это *изолирование токсиканта* и/ или его метаболитов из биологической матрицы (биожидкостей и тканей органов) с последующим исследованием концентрированного экстракта.

Большинство методов определения токсикантов и/ или его метаболитов требует *пробоподготовки* образцов. Существует два методологических подхода к подготовке проб:

* выделение токсикантов и/ или его метаболитов с полным разложением матрицы (при анализе неорганических веществ); * выделение токсикантов и/ или его метаболитов с частичным разложением или без разложения матрицы (при анализе органических веществ).

Основная цель пробоподготовки — отделение анализируемого вещества (выделение, изолирование) от основной массы экзогенных веществ и биоматрицы — достигается выполнением ряда важных процедур. К ним относятся удаление возможных загрязнений, увеличение концентрации аналита, превращение аналита в форму, пригодную для экстракции, разделение и некоторые другие.

К настоящему моменту не найдено универсального способа пробоподготовки, позволяющего выделить любой из предполагаемых токсикантов. В исследовании на «неизвестный яд» традиционным остается использование отдельных аликвот биопроб и определенного способа пробоподготовки, направленного на выделение той или иной группы токсикантов, различающихся по физико-химическим свойствам.

Анализируемые объекты, содержащие токсичные вещества, делятся:

* на биожидкости (моча, плазма, сыворотка, слюна, слезы, спинномозговая жидкость, лимфа, сперма и др.); * органы и ткани (мышечные и жировые ткани, волосы, ткань зубов, хрусталика глаза, мозга, печени, почки, легких, яичников и т.д.); * небиологические образцы (вещественные доказательства, например древесина, чернила, спиртовые и водные настойки, разнообразные пищевые продукты и др.).

Не только каждая из этих групп, но и каждый биообъект группы имеет морфологические особенности и требует особой аналитической процедуры пробоподготовки. Способы изолирования токсикантов из мочи, крови и тканей значительно различаются. Так, процедура удаления белков, обычно необходимая для крови и плазмы, совсем не обязательна для мочи, содержащей небольшое количество белка. Еще бóльшие сложности представляет пробоподготовка разложившихся объектов исследования из-за значительного количества соэкстрагентов в полученном экстракте (см. п. 3.5).

Этапы преданалитической подготовки пробы:

1) предварительная обработка;

2) гидролиз конъюгированных метаболитов (не всегда);

3) экстракция (или другой вид извлечения, например озоление или перегонка с водяным паром, микродиффузия или диализ и т.д.);

4) очистка;

5) дериватизация (не всегда).

Некоторые этапы опускаются в зависимости от конкретной аналитической задачи и природы токсиканта (см. гл. 6–10).

1. Способы предварительной обработки образцов

Они зависят от выбора методов исследования, природы токсиканта, типа биообъекта, других факторов и включают:

* фильтрацию; * центрифугирование; * ультразвуковую обработку; * разведение; * депротеинизацию (цельной крови, плазмы); * ферментативную обработку (волос, ткани); * гомогенизацию (ткани).

2. Гидролиз конъюгированных метаболитов

Гидролиз проводится с целью получения свободных метаболитов и возможности их дальнейшего исследования. Конъюгированные метаболиты из-за высокой полярности и большой молекулярной массы нельзя анализировать, например, методом ГЖХ; они лучше растворяются в воде, чем в органических растворителях, что затрудняет экстракцию.

Кислотный гидролиз проходит быстро, прост в осуществлении. Однако вследствие неспецифичности реакции расщепления ковалентной связи, жестких условий проведения гидролиза в среде концентрированной кислоты при кипячении или нагревании в автоклаве под давлением образуется большое количество побочных продуктов и теряется информация о некоторых токсикантах (например, разрушение 6-МАМ — биомаркера героина, деградация бензодиазепинов до метаболитов и др., см. гл. 6).

Энзимный гидролиз под действием ферментов (например, β-глюкуронидазы, β-сульфатазы, трипсина и др.) является специфичным, проходит в мягких условиях, уменьшает образование побочных продуктов, в результате чего образец (после гидролиза) получается более чистым. Способ имеет недостатки: необходимость строгого соблюдения условий (pH, температура, состав буфера, активность фермента), длительное время инкубирования (12–20 ч), изменение активности фермента в зависимости от происхождения и сроков хранения, ингибирование фермента веществами, присутствующими в пробе (соли).

3. Экстракция

Основные задачи экстракции в ХТА заключаются в том, чтобы:

* сделать анализируемый образец совместимым с аналитическим прибором; * селективно обогатить пробу интересующим соединением; * предохранить аналитическое оборудование от загрязнений.

В ХТА принято делить большинство изолируемых агентов на вещества кислого, нейтрального, слабоосновного и основного характера. Экстракцией могут быть изолированы токсичные вещества, относящиеся к различным классам и группам химических соединений, в том числе нелетучие органические вещества: наркотики, ядовитые, сильнодействующие лекарственные вещества, пестициды и др.

Жидкость-жидкостная экстракция

Суммарный процесс взаимодействия токсичного вещества с биосистемой определяется многими факторами и прежде всего химической природой токсиканта. Вещества основного характера при щелочных значениях pH среды находятся в неионизированной форме, в то время как вещества кислотного характера будут ионизированы. Неионизированные формы соединений, как правило, лучше растворяются в липофильных органических растворителях, чем в воде. На этом принципе и основано изолирование токсичных веществ из биологических объектов.

При выборе методики экстракции необходимо учитывать, с одной стороны, характеристики анализируемого соединения: значение p*K~a~*, липофильность, растворимость в водных и органических средах, значение дипольного момента, а также его устойчивость к воздействию воздуха, света, температуры. С другой стороны, выбирая конкретную экстракционную систему, необходимо принимать во внимание характеристики растворителей: полярность, селективность, дипольный момент, плотность и поверхностное натяжение, смешиваемость с водой, летучесть органического растворителя и его безопасность для здоровья. Как правило, у растворителя, выбранного в качестве экстрагента из группы растворителей, удовлетворяющих условиям *жидкость-жидкостной экстракции* (ЖЖЭ) конкретного аналита, не существует особых преимуществ.

Выбор экстрагента — всегда компромисс между видом биообъекта, характером анализируемого соединения и свойствами растворителя. При выборе схемы экстракции, которая определяется природой токсиканта, морфологическими особенностями биообъекта, возможными методами исследования, эксперт должен обратить

внимание и на потенциальные фоновые соединения экзогенного и эндогенного характера, присутствие которых в анализируемом образце неизбежно. Количество фоновых соединений будет определяться видом объекта, условиями его хранения, особенностями поведения анализируемого образца в нем и другими факторами. Обязательным является учет возможного связывания токсичных соединений с макромолекулами биологической матрицы, в основном белками.

Оптимальный выход токсиканта и селективность выделения достигаются:

* подбором растворителей, * контролем pH среды, * соблюдением методики проведения операции.

Подбор растворителей. Полярность растворителя выбирают исходя из конкретных задач и общего правила: чем меньше полярность растворителя, тем лучше обеспечивается растворимость аналита в органической фазе. Неполярные растворители: гексан, гептан, диэтиловый эфир, циклогексан, толуол, хлороформ, бутилацетат, хлористый метилен. Относительно полярные растворители: спирты (амиловый, пропиловый, бутиловый), ацетон, этилацетат, ацетонитрил. Увеличение полярности растворителя достигается добавлением небольшого объема относительно полярного растворителя (этилацетата, изопропанола) к низкополярной фазе (гексану). Используют как одиночные растворители, так и многокомпонентные смеси.

Контроль pH среды. Оптимальное значение pH при проведении экстракции является функцией p*K~a~* аналита.

При *ненаправленном* анализе:

* для экстракции веществ кислого характера создают значение pH среды на 2 единицы ниже pK~a~; * для экстракции веществ основного характера создают значение pH среды на 2 единицы выше pK~a~.

Для скрининга веществ кислого и нейтрального характера используют ацетатные и фосфатные буферы, создающие для крови и кровьсодержащих тканей pH 4,5–7,4. Более кислая среда вызывает экстракцию из крови окрашенных веществ.

Для скрининга веществ основного и нейтрального характера создают pH 9,0–10,0 добавлением гидроксида аммония или буфера: карбонатного, насыщенного боратного, трис-гидроксиметиламинометана.

При исследовании *амфотерных* веществ (например, морфина) выбирают интервал pH, предварительно проведя расчеты по уравнению Гендерсона–Гассельбаха.

Для *ионизированных* веществ (четвертичные аммонийные соли) применяется ион-парная (ионно-парная) экстракция.

При *направленном* анализе значение p*Ka* токсиканта известно, поэтому величина pH может быть точно рассчитана по уравнению Гендерсона–Гассельбаха. Экстракцию проводят под строгим pH-контролем.

Соблюдение методики проведения операции. Учитывая плотность растворителей, подбирают их так, чтобы токсикант остался ***в нижнем слое,*** так как легче удалить растворитель, находящийся в верхнем слое, который затем отбрасывают. Если аналит планируют определять инструментальными методами, то экстракцию проводят без использования делительных воронок. Растворитель удаляют пастеровской пипеткой с помощью водоструйного насоса.

Добавление соли, раствор которой имеет нейтральную среду (***высаливание***), позволяет уменьшить растворимость аналита в водной фазе (из-за увеличения ионной силы), снижает смешиваемость воды с органическим растворителем (более резкая граница между двумя фазами) и возможность образования эмульсий.

Для веществ, являющихся очень *сильными основаниями (или кислотами)* проводят дополнительную очистку — реэкстракцию. Встряхивают органическую фазу с разбавленной кислотой, например 0,1 Н раствором H~2~SO~4~. Вещество основного характера переходит в ионизированную форму и лучше растворяется в водной фазе и хуже — в фазе органического растворителя. Эндогенные основания также могут быть соэкстрагированы. Подбор соответствующей величины pH среды и полярности растворителя позволяет удалить бóльшую часть

соэкстрактивных аминов из экстракта. Затем водную кислую фазу подщелачивают добавлением, например, раствора NaOH и встряхивают с новой порцией органического растворителя, чтобы перевести анализируемое вещество в органическую фазу. Органическую фазу отделяют, упаривают и анализируют.

В большинстве случаев *органическую фазу, содержащую токсикант*, промывают водой, которую затем отбрасывают. Этот этап должен быть тщательно *проконтролирован*. Например, если анализируемое вещество является сильным основанием, а промывная вода имеет слабокислую среду, то часть анализируемого вещества может перейти в водную фазу и будет наблюдаться большой разброс аналитических данных.

В связи с использованием современных инструментальных методов анализа (см. гл. 5) технология ЖЖЭ претерпела изменения. Отпала необходимость во фракционных разделениях и больших объемах опасных для здоровья растворителей (например, бензола и хлороформа), появилась возможность использовать однократную экстракцию, расходуя значительно меньшие объемы растворителей и меньшие по весу пробы. При этом однократная экстракция позволяет получать воспроизводимые результаты количественного определения. Снизить возможность образования *нежелательных эмульсий* (с высоким содержанием жира в матрице) помогают рациональный выбор растворителя, центрифугирование, помещение пробы в морозильник, добавление изооктана (см. гл. 6–10).

В практике судебно-химических лабораторий РФ нередко продолжают использовать классические способы изолирования Стаса–Отто (настаивание с подкисленным спиртом), Швайковой–Васильевой (настаивание с водой, подкисленной щавелевой кислотой), Валова (для выделения веществ кислого характера), Крамаренко (для выделения веществ основного характера) и др.

Твердофазная экстракция

Концентрирование анализируемого соединения (или группы соединений) и удаление фоновых веществ способом *твердофазной экстракции* (ТФЭ) обеспечивается использованием специальных сорбентов. Обычно (но не всегда) в качестве сорбента применяют модификации силикагеля, содержащие амино-, нитрильные, полиольные группы, углеводородные привитые фазы и др. После сорбции биоматериала фоновые вещества на сорбенте вымываются водой или буферными смесями, а затем осуществляется десорбция нужных соединений подходящим органическим растворителем.

ТФЭ выполняют с помощью микроколонок, заполненных твердыми сорбентами. Пропускание аналитов через твердые сорбенты (картриджи или диски), аналогичные используемым в ВЭЖХ, основано на гидрофобных, водородных или ионных взаимодействиях. Система для вакуумирования позволяет одновременно анализировать серию 8–30 образцов и поддерживать одинаковые условия изолирования. Очистку производят с помощью смеси вода — буфер — органический растворитель. Аналит элюируют органическими растворителями.

ТФЭ обычно характеризуется почти количественным выходом и хорошей воспроизводимостью.

Для выполнения ТФЭ необходимо:

* провести кондиционированиеКондиционирование — это подготовка картриджа для ТФЭ к взаимодействию с пробой, т. е. очистка от загрязнений, появившихся во время транспортировки и хранения патронов. сорбента; * нанести пробу при pH 6,0–7,0 (фосфатный буфер); * промыть водой для удаления солей; * подкислить фазу (1М уксусной кислотой); * промыть 100% органическим растворителем (метанол) для удаления кислых и/ или нейтральных экстрактивных веществ матрицы; * элюировать системой хлороформ–ацетон (1:1) кислые (нейтральные) вещества; * элюировать подщелоченным метанолом (добавляют 1–2% раствор NH~4~OH) для удаления основных (нейтральных) веществ; * собрать элюат со скоростью 1–2 мл / мин.

Обычно разделение компонентов может происходить тремя способами:

* примеси удерживаются на патроне, а определяемое вещество проходит через него; * примеси проходят через патрон, а определяемое вещество сорбируется на патроне и затем элюируется более полярным растворителем; * определяемое вещество и примеси сорбируются на патроне, а затем последовательно разделяются на фракции при ступенчатом элюировании.

Изменяя и подбирая условия для ТФЭ (типы сорбентов для патронов, контроль pH, полярность элюентов), можно найти наилучшее решение конкретной аналитической задачи, получив максимально концентрированные и очищенные экстракты.

ТФЭ совместима с любыми методами, используемыми в ХТА.

Каждый индивидуальный этап ТФЭ зависит от вида анализируемого вещества, типа экстракционной колонки, метода определения.

В табл. 4-3 приведена сравнительная характеристика процедуры ЖЖЭ и ТФЭ.

Таблица 4-3. Сравнительная характеристика жидкость-жидкостной и твердофазной экстракции

Вид экстракции, эффективность извлечения	**Преимущества**	**Недостатки**
ЖЖЭ, эффективность около 75%, определяется отношением растворимости токсиканта в несмешивающихся фазах (коэффициент Нернста)	Рентабельность. Простота извлечения максимального количества токсикантов и их метаболитов в относительно чистом виде	Трудоемкость. Длительность. Низкий выход очень полярных аналитов. Деградация аналита при критическом значении pH. Образование нежелательных эмульсий. Работа с токсичными растворителями. Трудности автоматизации
ТФЭ, эффективность 71–99%, зависит от типа патрона	Высокий выход аналита (в том числе очень полярного). Получение чистых экстрактов*. Меньше зависит от изменений pH. Меньше расход растворителей. Процедура не загрязняет окружающую среду Процесс автоматизирован	Неоднородность распределения частиц сорбентов по размеру, что ведет к значительной вариабельности скорости потока жидкости через сорбент. Более дорогой метод. Возможна разница между партиями материала для ТФЭ, что влияет на выход аналита. Ограниченная емкость загрузки пробы

* Влияния матричных элементов биожидкостей практически не наблюдается, основными примесями, дающими высокоинтенсивные пики на хроматограммах (ВЭЖХ и ГХ-МС), являются пластификаторы (фталаты) и привитые группы сорбента.

Другие способы экстракции

Другие способы экстракции — сверхкритическая флюидная экстракция, экстракция в микроволновом поле, твердофазная микроэкстракция (ТФМЭ), экстракция с помощью иммуноаффинной хроматографии — обсуждаются ниже и в п. 5.2, гл. 6–10.

Сверхкритическая флюидная экстракция (СФЭ) предназначена для выделения из твердых или жидких проб матрицы органических веществ путем их перевода в «сверхкритический газ», что достигается контактированием пробы с газообразным экстрагентом при температуре и давлении выше его критической точки. В качестве экстрагентов можно использовать CO~2~, этан, этилен, пропан, SF~6~ и некоторые другие газы.

Сверхкритические жидкости имеют плотность, близкую к плотности обычных жидкостей, но характеризуются более высокими (на 2–3 порядка) коэффициентами диффузии и более низкой (на 1–2 порядка) вязкостью по сравнению с обычными жидкостями. Метод позволяет в десятки раз сократить время экстракции и полностью автоматизировать процесс. В качестве сверхкритического растворителя наиболее широко используют диоксид

углерода (как в чистом виде, так и в смеси с сорастворителями) из-за его высокой растворяющей способности, дешевизны, доступности, нетоксичности и невысоких критических параметров (*t*~крит~ 31,3 °С, *P*~крит~ 7,36 МПа).

СФЭ — двухстадийный непрерывный процесс, протекающий в специальных аппаратах, в которых осуществляется циркуляция растворителя (CO_2). Проба помещается в термостатируемую экстракционную камеру. Изменением давления и температуры в экстракционной колонке создаются необходимые условия для перехода CO_2 в сверхкритическое состояние, при котором начинается процесс экстракции. Жидкий CO_2 заполняет цилиндр шприцевого насоса и после переключения клапанов поступает в экстракционную камеру. Микропроцессорная система насоса позволяет определять и поддерживать необходимое количество CO_2, прокачиваемого через ячейку при заданном давлении.

На второй стадии экстрагент регенерируют путем сброса давления или изменения температуры, что приводит к полному осаждению извлеченных веществ. Затем рабочие параметры газа изменяют до требуемых значений и снова направляют его на первую стадию.

Основные характеристики: скорость подачи насоса 0,005–10 мл / мин, максимальное рабочее давление 40 МПа, объем шприцевого насоса 150 мл, объемы контейнеров экстракционной камеры — 0,5; 3,0; 10,0 мл.

СФЭ — селективный способ. Автоматизация процесса позволяет проводить экстракцию и очистку быстро и за один прием. Хорошие результаты получены для полихлорированных бензолов, диоксинов, полиароматических углеводородов, остатков углеводородного топлива из объектов окружающей среды, стабилизаторов и пластификаторов из пластмасс (см. гл. 9), а также неполярных и малополярных пестицидов (см. гл. 7), терпенов, альдегидов, стероидов, биологически активных веществ из растительного сырья (см. гл. 6).

Микроволновая экстракция основана на использовании энергии микроволнового излучения и позволяет количественно извлекать органические соединения из матрицы за 10–15 мин с использованием минимального количества органических растворителей (2–10 мл растворителя на 1 г образца).

*Твердофазная микроэкстракци*я (ТФМЭ) — миниатюризация способа ТФЭ с применением специальных игл на основе карбовакса, дивинилбензола, карбоксена.

Экстракция на жидкостных мембранах. Жидкостные мембраны — полупроницаемые жидкие фазы, разделяющие два других раствора (донорный и акцепторный). Удобно использовать жидкостные мембраны из органического растворителя, помещенного в поры полимерной подложки.

4. Очистка

Как следует из сравнительной характеристики процедуры ЖЖЭ и ТФЭ (см. табл. 4-3), очистка требуется *только после проведения ЖЖЭ* и достигается ионизацией аналита, удалением нейтральных загрязняющих веществ и реэкстракцией. Для этого обрабатывают аналит разбавленной кислотой, а после подщелачивания реэкстрагируют. В воде остаются белки, в органическом растворителе — липиды. Если в дальнейшем планируют исследование аналита методом ГЖХ с использованием пламенно-ионизационного (ПИД) или азотно-фосфорного детектора (АФД), а также проведение скрининга токсикантов, которые в кислой среде разлагаются, то проводить реэкстракцию не рекомендуется.

Вопрос дополнительной очистки грязных экстрактов *решается компромиссно*: оценивается значимость чистоты экстракта по отношению к потерям трудноэкстрагируемых веществ. Обычно такие экстракты высушивают и подвергают очистке перераспределением в гексан или гептан (наиболее гидрофобные растворители) и этанол (метанол) или используют гексан и ацетонитрил.

5. Дериватизация

Алгоритм действий при проведении ХТА должен быть разработан исследователем еще на стадии планирования экспертного исследования. Если в ходе анализа исследователь предполагает использовать газо-хроматографический метод для определения полярных и малолетучих соединений, то необходимо предусмотреть этап их дериватизации.

Дериватизация — это реакция получения производных искомого токсиканта путем преобразования *полярных групп в неполярные* без изменения основной структуры молекулы. При этом не только исключаются потери веществ из-за низкой летучести и сорбции, но и улучшаются характеристики газохроматографического анализа (см. п. 5.3). При хроматографическом исследовании токсикологически важные вещества делят на три группы: 1) летучие вещества; 2) нелетучие или менее летучие вещества, которые после соответствующей дериватизации становятся достаточно летучими и термически стабильными; 3) вещества, которые из-за высокой молекулярной массы не могут быть летучими даже после дериватизации (например, полимеры).

Для веществ, относящихся ко *второй группе*, проведение дериватизации с целью образования летучих производных *необходимо*. Ее проводят с помощью реакций ацилирования (уксусный ангидрид, трифторуксусный ангидрид, пентафторпропионовый ангидрид и др.), алкилирования (например, метилирование диазометаном и др.), силилирования [*BCA* — N,O-бис (триметилсилил) ацетамид, *BSTFA* —бис (триметилсилил) трифтороацетамид, *SILYL*-991 — *BSTFA,* содержащий 1% триметилхлорсилана (*BSTFA-TMCS* 99:1), *MSTFA* — N-метил-N-триметилсилилтрифтороацетамид и др.]. Термин «силилирование» означает замещение подвижного водорода в функциональных группах (например, –COOH, –OH, –NH или SH) силильной группой для улучшения хроматографических характеристик и увеличения летучести соединений.

При выборе реагента для дериватизации учитывают:

* устойчивость дериватов; * образование для каждого соединения деривата только одного вида; * отсутствие побочных продуктов; * эффективность хроматографического разделения анализируемых компонентов; * наличие интенсивных пиков в МС, обеспечивающих хорошую чувствительность; * отсутствие расщепления пиков дериватов на хроматограмме.

Для дериватизации одного соединения может быть использовано несколько реактивов в зависимости от числа функциональных групп, которые необходимо блокировать. Проведение дериватизации значительно улучшает определение низких концентраций (нг / мл) анализируемых веществ в биологическом материале. Вследствие гидролитической неустойчивости продуктов дериватизации, приводящей к последовательной потере введенных групп вплоть до образования исходных соединений, дериватизацию проводят непосредственно *перед газохроматографическим* определением.

При сравнении способов дериватизации предпочтение (во многих случаях) отдается силилированию фторсодержащими реагентами (например, *BSTFA* и *MSTFA*), что практически не приводит к загрязнению детекторов (АФД, ПИД и масс-спектрального) газового хроматографа (см. п. 5.3).

Триметилсилилирование проводят в мягких условиях, оно универсально, увеличивает молекулярную массу. Силилирование функциональных групп токсикантов значительно повышает надежность количественного определения таких веществ, как морфин (спиртовый и фенольный гидроксилы), бензоилэкгонин (карбоксильная группа), метилендиоксиметамфетамин — МДМА (аминогруппа), фенобарбитал (амидогруппа).

Процедура дериватизации: выпарить досуха экстракт, полученный после ЖЖЭ или ТФЭ, добавить дериватизирующий реагент, нагреть при 70 °С в течение 20 мин и 1–2 мкл ввести в инжектор хроматографа.

Особенности преданалитической подготовки пробы при определении токсикантов, относящихся к группе летучих ядов

Отнесение токсикантов к группе летучих ядов основано на низких температурах кипения этих веществ (см. гл. 7). Необходимо отметить два обстоятельства:

* не может быть универсальной схемы изолирования токсикантов и/ или их метаболитов, относящихся к группе так называемых летучих ядов, вследствие разнохарактерности анализируемых соединений; * способ изолирования всегда выбирают в зависимости от последующего аналитического метода, с помощью которого токсикант и/ или его метаболиты будут исследоваться.

Летучие яды в основном определяют методом ГЖХ. Особенности подготовки пробы к определению методом ГЖХ описаны в п. 5.3.2, 5.3.3 и 7.1–7.3.

Природа летучих ядов (низкие температуры кипения) предусматривает и такие способы изолирования, как простая перегонка (дистилляция), перегонка с водяным паром, микродиффузия, экстракция и сорбция.

Особенности преданалитической подготовки пробы при определении токсикантов неорганической природы

Пробоподготовка для проведения элементного анализа биообъекта состоит из двух этапов:

* деструкция биологической матрицы; * перевод элементов в форму, удобную для выполнения определения, обычно в раствор.

Правильный отбор проб и строгое следование аналитическим методикам являются решающими факторами, предотвращающими загрязнение (контаминацию) образцов при элементном анализе. Чтобы получить адекватные результаты анализа и избежать артефактов, необходимо выбрать наиболее подходящие для цели исследования биообъекты (см. п. 7.5).

Часто для определения элементов используют кровь, мочу, волосы, ткани, например костную, органы. Концентрации элементов в моче и крови коррелируют с прямым или косвенным воздействием токсиканта в недавнем временном интервале, либо с нарушением МЛГ вследствие других причин (см. п. 7.5). В ряде случаев высокий уровень металла, например кадмия, в моче является следствием его накопления в почечной ткани при хронической интоксикации. Диагностическим тестом может служить содержание металла в конкретной форме. Так, уровень металлотионеин-кадмия в моче имеет гораздо большее токсикологическое значение, чем общее содержание кадмия (см. п. 7.5).

Для выявления нарушения минерального обмена в организме и/ или хронического токсического воздействия отдельных элементов широко применяют исследование волос и ногтей, содержание макро- и микроэлементов в которых отражает элементный статус организма в целом. Пробы волос и ногтей являются не только интегральным показателем минерального обмена, но и надежным архивным материалом. С учетом постоянного совершенствования аналитической базы это открывает новые возможности при проведении судебно-химической экспертизы по прошествии длительного времени после отравления (воздействия), а также при сравнительной оценке влияния других факторов.

Сложность определения микроэлементов в биосубстратах связана как с низкими концентрациями элементов в тканях и биожидкостях, так и с постоянным их присутствием в организме, необходимым для обеспечения жизнедеятельности. Определение собственно химических элементов брутто проводят после полной деструкции органической матрицы.

Биосубстраты человека, используемые для элементного анализа, и способы пробоподготовки образцов приведены в табл. 4-4.

Стадия пробоподготовки, которая называется *минерализацией*, одна из самых *ответственных* в элементном анализе. Цель минерализации — ликвидировать органическую матрицу, не потеряв при этом определяемые элементы.

Таблица 4-4. Биосубстраты человека, используемые для элементного анализа, и способы пробоподготовки образцов

Матрица	Типичная пробопоготовка
Сыворотка крови и моча	Растворение в деионизированной воде
Кровь	Растворение в деионизированной воде и осаждение белков
Мышечная ткань	Минерализация азотной кислотой. Сухое озоление (сухая минерализация)
Жировая ткань	Растворение в азотной кислоте с последующим добавлением пероксида водорода. Сухое озоление
Костная ткань	Растворение в азотной кислоте
Волосы	Растворение в азотной кислоте.

Сухое озоление

Сухое озоление. Традиционный (сухой) способ минерализации — *прокаливание в муфельных печах* (нагревание возможно до температуры 1150 °С). Образец помещают в платиновый или керамический тигель и после озоления растворяют в кислоте (HCl). Высокая вероятность контаминации стенок тигля и муфельной печи не гарантирует получение надежных результатов для элементов, нормальное содержание которых составляет, например, 10^–10^%. При сухом озолении происходит потеря некоторых летучих элементов: Hg, As, (иногда Mn и Cr, Pb в присутствии Cl^—^).

Озоление на воздухе или *в атмосфере кислорода* имеет те же недостатки и всегда приводит к неизбежной потере летучих элементов.

Воздействие высокой температуры, вызывающее деструкцию матрицы, происходит при *окислительном сплавлении*, например со щелочами. При этом способе проба сильно загрязнена, потому что все примеси, неизбежно содержащиеся в щелочи, накапливаются и в пробе.

Мокрое озоление (наиболее распространенный способ минерализации) — это обработка образца концентрированными кислотами-окислителями, например азотной, серной, иногда хлорной. *Окисление азотной кислотой* предпочтительнее, поскольку ее можно эффективно очистить. При проведении мокрой минерализации потери микроэлементов снижаются. Кислоту (HNO~3~) добавляют непосредственно к свежему или высушенному образцу ткани, который затем нагревают конвекционно при помощи термоблока либо микроволнового поля. Для уменьшения риска контаминации можно использовать *фторопластовые* реакционные сосуды.

Часто мокрую минерализацию осуществляют *в автоклаве*. Многие неорганические материалы легко растворяются в кислотах, не производя при этом большого количества реакционных газов. Однако образцы, содержащие большое количество органического вещества, образуют при разложении значительные объемы побочных *газообразных* продуктов реакции. При микроволновом нагреве смесей органического материала с азотной кислотой до температуры выше 140–160 °С реакции разложения становятся экзотермическими, что приводит к увеличению давления в автоклавах и требует надежного контроля параметров в процессе разложения.

Разложение проб в автоклаве (с тефлоновым вкладышем) в микроволновой печи имеет следующие преимущества:

* количественное переведение в раствор летучих элементов; * наименьший уровень контаминации; * высокая скорость разложения (5–15 мин без учета времени остывания); * гомогенизация смеси (увеличивает скорость разложения); * высокое давление (ускоряет процесс разложения).

Однако такой способ имеет и недостатки. При слишком высокой температуре (выше 250 °С) или неудачном выборе параметров процесса может начаться плавление фторопластовых полимеров, что приведет к потери автоклавами жесткости и их разрушению. Как правило, при разложении органических матриц температура *не должна превышать 250 °С,* для белковых и углеводных матриц достаточно температуры 160 °С, для жиров — 180–200 °С.

Способ пробоподготовки образца в автоклаве, размещенном в микроволновой печи, является *официально признанным* и рекомендован в аттестованных методиках, *нормативных документах* и методических указаниях.

В зависимости *от выбора метода* измерения аналитического сигнала эффективной может быть пробоподготовка не только с *полной*, но и *с частичной деструкцией* матрицы (см. п. 5.4.2).

При фотоколориметрическом или атомно-абсорбционном определении металлов преимущественно используют минерализацию, при ГЖХ-, ТСХ-, ВЭЖХ-исследованиях — минерализацию и последующее получение хелатов определяемых металлов. Используя вольтамперометрию и полярографию, предварительно помимо минерализации проводят специальную подготовку пробы, а применяя ИХМ, не проводят пробопоготовку (см. п. 5.2 и 5.4.2).

Итак, *общий подход* к преданалитической пробоподготовке в ХТА определяется:

* типом анализа (СХА направленный или ненаправленный, КТА, допинг-контроль и т.д.); * типом биологической матрицы образца (биологические жидкости, ткани, органы и др.); * физико-химическими свойствами анализируемых веществ (предполагаемых токсикантов); * частными задачами ХТА; * техникой проведения процедуры.

В практической деятельности при выборе наиболее рациональной схемы преданалитической пробоподготовки, как правило, следует учитывать все указанные позиции.

Методики преданалитической подготовки образцов для определения конкретных токсикантов различной химической природы изложены в гл. 6–10.

4.3. Взаимосвязь между содержанием токсиканта в анализируемом биообъекте и интерпретацией результатов исследования

Если я рассуждаю логично,
это значит только то, что я
не сумасшедший, но вовсе
не доказывает, что я прав.

Иван Петрович Павлов (1849–1936), великий русский ученый-физиолог, создатель науки о высшей нервной деятельности, лауреат Нобелевской премии по физиологии (1904)

Даже при получении достоверных аналитических данных возможно неверное истолкование (интерпретация) конечных результатов ХТА. Например, нельзя использовать для объяснения влияния тех или иных обстоятельств на факт смерти в результате отравления концентрацию токсичного агента, которая определена *только* в образцах крови. Необходимо принимать во внимание данные о посмертном высвобождении и/ или перераспределении токсичных веществ из ткани в кровь, что может привести к закономерным разногласиям в оценке полученных результатов (см. **примеры в гл. 6-9)**.

4.4. Особенности методологии клинико-токсикологического анализа

Истина ничуть не страдает от
того, если кто-либо ее не признает.

Фридрих Шиллер (1759–1805), выдающийся немецкий поэт, драматург, философ, профессор истории, военный врач

Острые отравления развиваются в результате однократного, реже повторного воздействия токсичного вещества и характеризуются быстрым проявлением клинической картины.

При острых отравлениях *необходимо немедленное оказание медицинской помощи*, начиная с догоспитального этапа и продолжая в стационаре токсикологического или реанимационного профиля. В тех случаях когда клинические проявления на ранних стадиях развития интоксикации не позволяют установить причину отравления, проводят качественные и количественные исследования *в возможно короткие сроки* (максимум в течение 1–2 ч после поступления больного в стационар). Успех проведения ХТА при диагностике острых отравлений и в конечном счете успех лечения в значительной степени зависят от качества и скорости обмена информацией между клиницистом и химиком.

Объем и глубина проведения КТА в большинстве случаев определяется потребностями клиницистов. Подробное изучение клинической картины отравления, характерных симптомов отравления отдельными токсикантами — одно из основных условий адекватного выбора методов ХТА. Поэтому химик-токсиколог должен знать главные симптомы острых отравлений различными токсикантами (см. п. 1.4).

Объектами КТА при острых отравлениях, как правило, являются кровь, сыворотка или плазма, моча, содержимое желудка (промывные воды), слюна. Кровь, сыворотку или плазму в количестве до 10 мл обычно отбирают

при поступлении больного. В большинстве случаев отбор мочи затруднен, поэтому проводят катетеризацию и отбирают мочу в количестве до 50 мл. В содержимом желудка (при пероральном отравлении) обычно находится действующее вещество в высокой концентрации, поэтому собирают промывные воды. Слюну отбирают в пробирки (специальные пластмассовые контейнеры) при необходимости.

В клинических лабораториях широко используют метод ВЭЖХ и экспертные системы, обеспечивающие проведение исследований биообразцов на нескольких колонках с последующим детектированием в УФ и видимой части спектра и позволяющие на основе сопоставления времени удерживания и характеристик поглощения света с банком данных по токсикологически значимым веществам в автоматическом режиме идентифицировать и количественно определять до нескольких сотен веществ и их метаболитов.

При проведении КТА используют хроматографические (ТСХ, ГХ, ВЭЖХ), спектральные (УФ-спектрометрия, флуоресценция) и комбинированные (ГХ-МС, ВЭЖХ-МС) методы исследования (см. гл. 5). Анализ элементного статуса при подозрении на отравление металлами проводят в зависимости от показаний методами атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС) или методом индуктивно-связанной плазмы с масс-спектральным детектированием — ИСП-МС (см. п. 5.4.3 и 7.5). ТСХ используют главным образом при исследовании мочи и содержимого желудка (см. гл. 5). Из-за недостатка времени обычно применяют ограниченное количество хроматографических систем и способ последовательной обработки пластин различными проявляющими реактивами, используя экспертные системы для ТСХ.

Анализ спиртов и суррогатов, летучих ядов и газов проводят методом ГЖХ на капиллярных колонках с пламенно-ионизационным детектором или катарометром.

Анализ лекарственных препаратов и наркотиков проводят методом ГЖХ на капиллярных колонках с ПИД или АФД, с масс-спектрометром.

Анализ пестицидов проводят методом ГЖХ на капиллярных колонках с электронно-захватным и/ или АФД.

При *экспресс-диагностике* острых отравлений применяют:

* иммунохроматографические и иммуноферментные методы (см. п. 5.2); * ферментативные методы: определение активности алкогольдегидрогеназы по скорости окисления этанола до ацетальдегида (см. п. 7.1); определение активности ацетилхолинэстеразы (см. п. 7.4) и др. * спектрофотометрическое определение общей концентрации пептонов, низкомолекулярных белков; * цветные реакции непосредственно с биообъектами: определение фенотиазинов в моче по реакции с FPN-реактивом; определение салицилатов, параквата, цианидов и других токсикантов в моче; определение оксида углерода(II) в цельной крови; * биохимические методы: определение глюкозы в плазме крови; определение кетонов в моче.

4.5. Особенности методологии химико-токсикологического анализа при определении наркотиков у живых лиц

Что случилось однажды,
может никогда больше не случиться.
Но то, что случилось два раза,
непременно случится и в третий.

Арабская пословица

Определение в биологических пробах живых лиц наркотических, психотропных и сильнодействующих веществ (см. гл. 6) проводят с целью *установления факта их присутствия* в организме человека.

Для определения наркотических, психотропных и сильнодействующих веществ чаще всего как наиболее информативный биообъект исследования используется *моча*. Образец мочи обычно может быть получен в достаточном количестве, а концентрация психоактивных веществ и/ или их метаболитов в моче, как правило, относительно высокая. К недостаткам этого биообъекта следует отнести возможность *фальсификации* образца. Для установления факта употребления наркотика спустя недели или месяцы следует провести исследование волос

и ногтей (см. ниже). В табл. 4-5 приведены данные литературы о времени возможного выявления часто используемых наркотических и психотропных веществ и некоторых их метаболитов в моче.

Таблица 4-5. Время возможного выявления часто используемых наркотических и психотропных веществ и некоторых их метаболитов в моче

Вещества	**Время возможного выявления**
Психостимуляторы	
Амфетамин	2–3 сут
МДМА (экстази)	30–48 ч
Метамфетамин (первитин)	48 ч
Кокаин	6–8 ч
Метаболит кокаина бензоилэкгонин	2–3 сут
Барбитураты	
Кратковременного действия (циклобарбитал)	24 ч
Среднего действия (пентобарбитал)	48–72 ч
Длительного действия (фенобарбитал)	7 сут
Производные бензодиазепина	
Кратковременного действия (триазолам)	24 ч
Среднего действия (темазепам, хлордиазепоксид)	40–80 ч
Длительного действия (диазепам, нитразепам)	7 сут
Опиаты	
Метадон (дозы для поддерживающего лечения)	7–9 сут
Кодеин / морфин	24 ч
Морфина глюкуронид	48 ч
Кодеина глюкуронид	3 сут
Пропоксифен / норпропоксифен	6–48 ч
Дигидрокодеин	24 ч
Бупренорфин	48–56 ч
Соединения бупренорфина	7 сут
Каннабиноиды (марихуана, гашиш)	
Однократное употребление	3 сут
Употребление со средней частотой	4 сут
Частое употребление (ежедневное)	10 сут
Длительное частое употребление	36 сут
Другие	
Метаквалон	7 сут
Фенциклидин (PCP)	8 сут
ЛСД	24 ч
Клофелин (однократное терапевтическое употребление)	48–60 ч

Подавляющее большинство химико-токсикологических исследований на наличие наркотиков у живых лиц носит *ненаправленный характер*. Из поступающей сопроводительной информации известны, как правило, две позиции:

* выявлены (не выявлены) наркологом клинические признаки наркотического опьянения; * какое средство (или описание его внешнего вида) было изъято, если этот факт имел место.

Направленность исследования имеет крайне важное значение, так как определение некоторых веществ не укладывается в общепринятые схемы ХТА, существуют частные методики обнаружения отдельных веществ с использованием специального оборудования (см. гл. 6). В соответствии с требованиями надежности, достоверности и доказательности результатов анализов, а также рекомендациями ВОЗ и общепринятыми мировыми стандартами, лабораторное исследование на наличие наркотических веществ должно состоять из двух этапов: предварительного (скринингового) и подтверждающего.

Согласно международным правилам, которые приняты в РФ, методы определения наркотиков разделяются на три категории (табл. 4-6).

Таблица 4-6. Международная классификация методов определения наркотиков

Категория		
A	**B**	**C**
МС	ТСХ	Цветные тесты
ИК-спектрометрия	Микрокристаллоскопические тесты	Иммунологи-ческие методы
Спектроскопия ядерного магнитного резонанса	ГХ	Определение точки плавления
	ЖХ	УФ-спектро-скопия
	Спектрометрия ионной подвижности	Измерение флуоресценции
	Капиллярный электрофорез	
	ботаническое исследование следует проводить для наркотических средств, изготавливаемых не только из растения рода Cannabis, а также для растительного сырья и частей растений Гавайской розы, шалфея предсказателей, голубого лотоса, мака снотворного, согласно постановлению правительства № 934 от 27 ноября 2010.	

Предлагаются следующие варианты их использования:

* A + A (или B, или C) * B + B + B (или C).

Комбинированный метод (ГХ-МС) рассматривают как два раздельных метода.

При *скрининговых исследованиях* обнаружения наркотических средств, психотропных и сильнодействующих веществ часто используют иммунохроматографический анализ (ИХА) на тест-полосках, ПФИА и ИФА (см. п. 5.2). При получении *положительного результата*, т. е. когда концентрация вещества превышает пороговую, необходимо провести дальнейшее исследование образца мочи подтверждающими альтернативными методами. Проведения дальнейшего исследования при отрицательном результате не требуется.

В лабораториях применяют различные комбинации методов категории А, В и С.

Все пробы, поступающие в лабораторию, подвергаются обязательному предварительному иммунохимическому исследованию на наличие трех основных групп наркотических веществ: опиатов и амфетаминов с использованием соответствующих наборов реагентов для ПФИА, каннабиноидов — с помощью тест-полосок и ПФИА. В случае когда наркологом выявлена клиническая картина наркотического опьянения, но по результатам предварительных исследований опиатов, амфетаминов и каннабиноидов в образце мочи не обнаружено, данный образец направляется на дополнительное расширенное иммунохимическое исследование на наличие бензодиазепинов, барбитуратов, метадона, кокаина (по бензоилэкгонину), экстази, фенциклидина с дальнейшим подтверждающим определением методом ГХ-МС.

При *направленном исследовании* образцов мочи на наличие триметилфентанила и клофелина в лаборатории используется ИФА с соответствующими наборами реагентов. Так, при приеме обычной разовой терапевтической дозы клофелина (60–120 мкг) он обнаруживается с помощью ИФА даже спустя 48–60 ч.

Метод ТСХ является условно подтверждающим только при совпадении с результатами иммунохимических исследований. Иногда для получения достоверного результата используют три метода исследования (до 5% всех проб), что приводит к увеличению срока выдачи результатов на 1–2 дня. Например, если при ТСХ не удалось надежно идентифицировать то или иное вещество (в большинстве случаев это относится к следовым количествам веществ), то проба направляется дополнительно на анализ методом ГХ-МС. ГХ-МС — основной подтверждающий метод химико-токсикологического исследования. Это особенно важно при обнаружении каннабиноидов, бензоил- и метилэкгонина (метаболитов кокаина), 6-МАМ (метаболита героина), фенциклидина, триметилфентанила, буторфанола (стадола), декстрометорфана, доксиламина (донормила), кетамина, фармакологически активных пищевых добавок и др.

Метод ГХ является подтверждающим для ограниченного числа наркотических средств и психотропных веществ. В частности, при серийных анализах он используется для подтверждения основного метаболита марихуаны в моче — ∆^9^-тетрагидроканнабиноловой кислоты. Парофазный метод ГХ применяется при обнаружении и количественном определении летучих токсичных веществ в моче и крови токсикоманов после одурманивания органическими растворителями, бензином, клеем «Момент» и др. При этом наиболее часто обнаруживаются толуол, ацетон, этилацетат.

Большой трудностью при выполнении химико-токсикологических исследований является отсутствие необходимых стандартов наркотических веществ. Отечественная промышленность такой вид продукции выпускает в ограниченном ассортименте, заказ по зарубежным химическим каталогам невозможен в нашей стране из-за законодательных запретов. На сегодняшний день в качестве стандартов наркотических веществ официально можно использовать наборы калибраторов и «контролей» наркотических веществ с низкими концентрациями в моче; экстракты мочи наркоманов, охарактеризованные методом ГХ-МС. При анализе методом ГХ-МС используют также библиотечные данные характерных МС наркотических веществ. Сложность интерпретации полученных результатов исследований связана со следующими моментами:

* об употреблении того или иного вещества свидетельствует присутствие его метаболитов, однако они могут быть одинаковыми у разных веществ (см. гл. 6); * отрицательный результат может быть следствием позднего срока взятия пробы после приема наркотика; * пороговая чувствительность метода исследования может превышать порог возможного выявления (cut-off) вещества (табл. 4-7); * состав пробы может быть изменен, фальсифицирован при заборе; * иногда трудно (требуются дополнительные исследования) отличить запрещенные соединения и разрешенные лекарственные средства из-за схожести их структуры.

Таблица 4-7. Пороги обнаружения (*cut-off*) наркотических и психотропных веществ в моче, рекомендованные за рубежом, нг/мл

Вещество или группа веществ	США		ЕС		Великобритания	
	ИХ	ГХ / МС	ИХ	ГХ / МС	ИХ	ГХ / МС
Амфетамины:	1000		300		300	
амфетамин	1000	200	1000	200	1000	200
метамфетамин	500	500	500	200	500	200
МДМА (экстази)	500		500	200	500	200
Опиаты:	2000		300		300	
морфин	2000	2000	300	200	300	300
кодеин	2000	2000	300	200	300	300
6-МАМ		10		10		10
Каннабиноиды (ТГК-СООН)	50	15	50	15	50	15
Кокаин (бензоилэкгонин)	300	150	300	150	300	150

Метадон	300	300	300	300	300	300
Фенциклидин	25	25			25	25
Барбитураты:	300	200	300	200	300	200
фенобарбитал	200*					
амобарбитал	200*					
секобарбитал	200*					
Бензодиазепины:	300	200	300	200	300	200
нордиазепам	100					
оксазепам	200*					
темазепам	200*					
Гидроксиальпрозалам	100					

* Используется также порог 100 и 300 нг / мл.

Ввиду высокой чувствительности ИХМ следует осторожно подходить к оценке и интерпретации полученных результатов при анализе образцов с крайне малым содержанием наркотических веществ и возможным влиянием пищевых добавок и общедоступных распространенных лекарств. Наиболее проблематичная группа веществ в отношении корректной трактовки результатов — опиаты. Так, например, при умеренном (обычном) употреблении кондитерских и хлебобулочных изделий с маком ИХМ (особенно ИХА и ИФА) дают положительный результат на опиаты в образце мочи, собранной спустя 1–8 ч после употребления. При анализе методом ГХ-МС при этом обнаруживается морфин в следовых количествах.

При оценке результатов анализа опиатов необходимо дифференцировать лекарственное потребление кодеина и нелегальный прием опиатных наркотиков. Очень важно, что после употребления кодеина, который входит в состав многочисленных противокашлевых лекарственных препаратов, одним из его метаболитов является морфин (морфин свободный — 1%, морфина 3-глюкуронид — 5–13%). Несмотря на то что однозначные критерии дифференцирования отсутствуют, наиболее вероятна следующая оценка результатов: при обнаружении методом ГХ-МС незначительного количества морфина (менее 30 нг / мл) на фоне среднетерапевтических концентраций кодеина результаты анализа свидетельствуют об обнаружении только кодеина (см. гл. 6).

Еще один важный пример: при однократном приеме 1 мл валокордина (содержащего 20 мг фенобарбитала) возможен положительный результат определения барбитуратов ИХМ даже через 4–7 дней после употребления лекарства.

Ограничения на применение мочи и крови в качестве объектов исследования следующие:

* быстрое разложение как самих образцов, так и исследуемых веществ, что обусловливает необходимость проведения исследований в возможно короткие сроки после их отбора; * сложности в интерпретации результатов при обнаружении веществ в количествах, близких к пределу их обнаружения; * узкий временной интервал, в течение которого возможно обнаружение вещества; * высокая вероятность ложноположительного результата в ситуации случайного или предумышленного загрязнения образца.

Альтернативными объектами для определения наркотиков являются волосы, ногти и потожировые выделения кожи.

Необходимо проводить раздельное определение веществ, адсорбированных поверхностью этих объектов, и веществ, находящихся *in vivo*. В случае обнаружения наркотиков на поверхности исследуемых объектов следует провести процедуру отмывки с обязательным контролем чистоты. Например, после употребления наркотиков их концентрация на поверхности кожи, волос и ногтей обычно составляет 10^–6^–10^–7^ г, а после отмывки поверхностных загрязнений — 10^–8^–10^–11^ г.

Имеются схемы пробоподготовки *образцов кожи, волос и ногтей* и методы определения в них наркотиков.

Особенности анализа объектов небиологического происхождения на наличие наркотиков (криминалистический анализ)

Разнообразие видов и форм контролируемых веществ, а также противозаконная деятельность их производителей, направленная на маскировку и сокрытие своей продукции, обусловливают специфические аспекты криминалистического анализа при обнаружении наркотических средств, психотропных и сильнодействующих веществ.

Для отнесения того или иного объекта к какому-либо виду наркотиков с целью установления мер контроля над его оборотом требуется проведение исследований этого объекта несколькими независимыми методами.
По сложившейся международной и отечественной практике во многих случаях достаточно двух-трех методов.
Иногда при анализе сложных смесей число методов значительно увеличивается.

Применяемые экспертами-криминалистами методы исследования делятся на предварительные и подтверждающие (табл. 4-8).

Методы МС, ИК-спектрометрии и спектрометрии ядерного магнитного резонанса дают информацию о структуре исследуемого вещества и являются арбитражными. В случае недоступности методов структурного анализа используют комбинацию как минимум трех методов. Например, для отнесения порошка неизвестного происхождения к наркотическому средству героину достаточно подвергнуть порошок капельному химическому анализу с помощью селективных реактивов, используемых по соответствующей схеме, и исследованию методом хромато-масс-спектрометрии. В то же время для отнесения растительного материала к наркотическим средствам, получаемым из конопли, достаточно (но не всегда) применить капельные химические тесты на эти наркотики, ТХС и провести фармакогностическое микро- и макроскопическое определение. При этом эксперт всегда должен помнить о том, что коноплю наркоманы часто используют в качестве носителя для более тяжелых наркотиков: многочисленных производных фенилалкиламина, ЛСД, фенциклидина или ДОБ (см. гл. 6).

Таблица 4-8. Методы исследования наркотиков в криминалистических лабораториях

Методы исследования		
предварительные	**подтверждающие**	**арбитражные**
Капельные химические тесты	ТСХ	ИК-спектрометрия
Определение точки плавления, кипения или замерзания	ГХ	МС
УФ-спектрометрия	ВЭЖХ	Спектрометрия ядерного магнитного резонанса
Флуориметрия	Спектроскопия ионной мобильности	Спектрометрия в ближней ИК-области
ИХМ	Капиллярный электрофорез	Раман-спектрометрия
	Микрокристаллоскопические тесты	
	Макро- и микроскопические фармакогностические исследования	

Перед экспертом после отнесения им того или иного образца вещества, изъятого из незаконного оборота, к наркотическим средствам или психотропным веществам обычно встают следующие вопросы:

* Составлял ли ранее этот образец единую массу с другими образцами, изъятыми у данного субъекта? * Существует ли связь между этими образцами и каким-либо установленным дилером? * Если такая связь существует, то какую полезную информацию можно получить о цепи распространения наркотика на местном, национальном, региональном или международном уровне? * Кустарного или заводского производства данные образцы? * Возможно ли установить источник, в том числе регион, производства наркотика? * Какие методы применялись для его производства? * Какие реактивы и прекурсоры при этом использовались?

Для решения этих вопросов эксперт на основе исследования предоставленных образцов наркотика должен:

* установить специфические связи между образцами наркотика и сравнить их с результатами исследований поступавших ранее образцов; * классифицировать результаты на связанные между собой группы, принимая во внимание всю совокупность образцов, имеющихся в его распоряжении.

Основной объем незаконного оборота наркотиков составляют наркотики растительного происхождения, получаемые из мака снотворного, конопли, эфедры и кокаинового куста. Наряду с характерными особенностями, присущими растительному сырью, наркотические средства, произведенные в географической близости друг от друга, будут иметь близкий состав.

Любой наркотик растительного происхождения, изымаемый из незаконного оборота, является смесью веществ, и крайне редко встречаются образцы высокоочищенных наркотиков. При этом качественный и количественный состав получаемых продуктов непостоянен и, более того, изменяется по мере продвижения его от производителя к потребителю.

Все вещества, входящие в состав наркотического средства, делятся на четыре основные группы:

* природные компоненты, присутствующие в растительном сырье, например в опии или листьях коки, используемом для получения героина или кокаина и перешедшие из него в конечный продукт; * полупродукты, образующиеся на различных этапах производства и характеризующие это производство; * компоненты, добавленные с различными целями в наркотик на пути от производителя к потребителю; * компоненты, попавшие в наркотик случайно или образовавшиеся в нем при транспортировке, хранении и других операциях.

Образцы одного и того же наркотика, полученного по одной и той же технологии, имеют один и тот же качественный химический состав, за исключением веществ, добавляемых на различных этапах цепи распространения. Их количественный состав (соотношения компонентов) часто различается, что обусловлено специфическими особенностями исходного сырья, методами получения или производства, условиями распространения и хранения. Схожие проблемы появляются при исследовании синтетических наркотиков.

Эксперт должен решать многие задачи, от установления связей между наркоторговцем и конкретным потребителем наркотика до выявления цепи распространителей и определения географического региона, в котором наркотик был произведен.

Состав наркотиков в значительной степени зависит от метода производства и способа дальнейшей их транспортировки к месту продажи. На каждом из этапов наркотрафика в наркотик добавляются различные компоненты. Это создает ситуацию, когда партия, полученная в одной подпольной лаборатории, может распространяться через разные сети и, следовательно, может иметь различный химический состав. С другой стороны, конкретный распространитель (как правило) добавляет в наркотики, полученные от разных производителей, одни и те же компоненты.

При хранении наркотиков растительного происхождения изменяется их качественный и количественный состав, что необходимо учитывать при проведении *сравнительных исследований*. Например, при хранении марихуаны и гашиша происходит взаимопревращение каннабиноидов, в образцах героина — окисление аскорбиновой кислоты, которой его часто разбавляют, при повышенной влажности и температуре частично разлагаются наркотики, имеющие сложноэфирные группировки, например героин и кокаин.

Цель углубленного и расширенного исследования наркотиков — выявить *криминалистически значимые признаки* в конкретных образцах наркотика, исходя из всей совокупности возможного изменения их качественного и количественного состава. Многообразие таких признаков требует проведения значительно большего объема исследований по сравнению с обычным криминалистическим подходом и соответственно расширения круга исследований.

Отличительной особенностью методов, применяемых при углубленных исследованиях наркотиков, является необходимость выявления и идентификации *близких по своим химическим свойствам компонентов, содержащихся в исследуемом продукте*, на уровне ниже 0,1–0,001%, по сравнению с действующим началом. Например, в опии

на указанном уровне концентраций содержится несколько десятков алкалоидов, которые в зависимости от условий выделения могут переходить в героин (частично или полностью, в неизменном виде или измененными). Аналогичная ситуация характерна для других наркотиков растительного происхождения. Для определения подобных природных компонентов, переходящих в конечный продукт (наркотик), требуется использование комплекса физических, физико-химических и биологических методов (см. табл. 4-8). Следует установить:

* внешний вид наркотика: цвет, запах, консистенцию, способ его упаковки; * химический состав основных действующих компонентов наркотического средства, а также промежуточных и побочных компонентов их биосинтеза, зависящий от климатических условий созревания растительного сырья: влажности, температуры, продолжительности солнечного дня, характера почвы, высоты над поверхностью моря, фазы вегетации в период сбора сырья и других факторов; * химический состав специфических компонентов наркотического средства, образующихся в процессе характерного для каждого региона способа производства, обусловленного условиями экстракции, интенсивностью обработки кислотами и щелочами, воздействием температуры, степенью и способом очистки конечного продукта и прочими факторами; * состав компонентов, добавленных к наркотику или привнесенных в него извне перед продажей или употреблением: различные сахара, лекарственные вещества, другие наркотики или пестициды; * наличие в конечном продукте специфической микрофлоры, насекомых, пыльцы растений или посторонних, не свойственных данному наркотику примесей.

4.6. Особенности интерпретации результатов химико-токсикологического анализа

Там Истина живет, как некий властелин,
В недосягаемом своем уединенье.

Александр Леонидович Чижевский (1897–1964),
выдающийся советский ученый биофизик,
один из основоположников гелиобиологии,
космической биологии и космической экологии,
поэт, художник, «русский Леонардо да Винчи»

При интерпретации данных ХТА необходимо учитывать многие факторы, имеющие значение для корректной оценки результатов. Так, при выполнении СХА и КТА необходимо учитывать принятую дозу, способ и частоту введения, толерантность к действию токсичных веществ, время, прошедшее с момента отравления, особенности тканевого распределения токсикантов, потому что это важно для правильного определения места отбора пробы. Значимость медико-правовой классификации смерти (ущерба здоровью) и правильного отбора образцов всегда остается приоритетной.

Достоверное количественное определение токсикантов в крови, печени, содержимом желудка или других биообъектах является надежной основой для интерпретации полученных результатов ХТА. Токсичные и летальные дозы известны для многих соединений и отражены в различных справочных материалах.

Должно быть обязательно проведено исследование на соответствие терапевтической дозы принятого потерпевшим лекарственного препарата и его концентрации, обнаруженной в биологических образцах в результате ХТА, даже если вскрытие установило совсем *другую* причину смерти. Так, в случае апоплексического удара танатолог может потребовать провести скрининг на присутствие противоэпилептических средств, чтобы определить, было ли использовано такое медикаментозное лечение. То же самое справедливо в отношении теофиллина при смерти больного бронхиальной астмой. Некоторым лицам, пытавшимся покончить жизнь самоубийством, могли быть прописаны для снятия депрессии или лечения других заболеваний терапевтические дозы соответствующих лекарств. Количественное определение этих препаратов в биообъектах может показать, есть ли связь между фактом смерти (ущерба здоровью) и использованной дозой вещества. В судебной токсикологии отрицательный лабораторный результат имеет не меньшую значимость, чем положительный.

В отношении других факторов (например, наркотрафика употребленных наркотических средств или результатов лабораторного исследования образцов небиологического происхождения и т. п.) должно быть доказано их влияние на факт смерти (ущерба здоровью).

Эксперт должен различить случаи хронического использования высоких доз токсичного вещества (лекарственного средства) и острого отравления при передозировке.

Случаи хронического и острого отравления можно различить, если сопоставить концентрации токсичного соединения и его метаболитов в крови. Как правило, более высокая концентрация метаболита в крови свидетельствует о хроническом применении, а значительное превышение концентрации токсиканта над концентрацией метаболита — об остром отравлении.

Причина смерти не может быть установлена *только* на основании данных о концентрации токсичного вещества *в крови*. Равные концентрации токсичных веществ в печени и крови (при анализе образца печени) будут свидетельствовать о хроническом использовании высоких доз. В случае острого отравления концентрация токсиканта в печени будет значительно превышать концентрацию в крови.

Знание *способа введения* токсичного соединения в организм также имеет значение, во-первых, для определения максимальной концентрации токсиканта и времени, за которое эта концентрация достигнута, а во-вторых, для правильной интерпретации результатов, полученных при анализе образцов различных органов. Внутривенное введение и ингаляция первоначально дают более высокую концентрацию токсичного соединения в крови, в то время как оральное, внутримышечное и подкожное введение вследствие медленного всасывания — более низкую концентрацию. При внутривенном введении или ингаляции (что приводит к более высокой концентрации токсиканта не только в крови, но и в легких, мозге и даже почках) в печени обнаруживается более низкая концентрация токсичного соединения, чем при оральном введении.

Для оценки быстро всасывающихся токсичных соединений необходимо знать их концентрации в крови и печени. Следует учитывать, что кровь продолжает циркулировать обычно в течение нескольких минут после остановки дыхания, поэтому концентрация токсичных веществ при внутривенном введении будет намного меньше, чем при оральном введении такой же дозы.

При оральном приеме большой дозы почти всегда концентрация токсиканта в печени более чем в 3 раза превышает таковую в крови, в то время как после внутривенного введения его концентрации в печени и в крови почти равны.

При ингаляции концентрация токсичного вещества в тканях такая же, как после внутривенного введения, возможно, в легких она более высокая.

Другие типы введения изучены недостаточно, чтобы их сравнивать.

Высокая концентрация токсичных веществ в крови *на раннем этапе* после внутривенного и орального введения будет соответствовать более высокой концентрации в легких и печени, в то время как *в период выведения* концентрации в желчи и моче будут более высокими по сравнению с концентрацией в крови.

В то же время *концентрация метаболитов* может быть выше концентрации исходного соединения почти во всех тканях, что особенно важно в отношении метаболитов, обладающих фармакологической активностью.

Если известно или предполагается, что смерть наступила в результате отравления лекарственным веществом после одноразового приема, то можно оценить интервал между введением и смертью на основе определения концентрации токсиканта в тканях. Так, в 245 исследованных случаях смерти, вызванной барбитуратами, концентрация в печени обычно в 4 раза превышала таковую в крови, если время между приемом и смертью составляло более 5 ч.

Определено, что концентрация морфина в крови в случае введения смертельной дозы героина обратно пропорциональна времени в случаях, если жертва отравления живет более 24 ч.

Токсичные вещества основного характера дают относительно низкие концентрации в крови, и соотношение концентрации в печени и крови часто превышает отношение 10:1.

Соединения кислотного характера дают умеренно высокие концентрации в крови, и отношение концентрации токсиканта в печени к концентрации в крови составляет 2:1–5:1.

Для нейтральных соединений характерны очень высокая концентрация в крови и почти одинаковое распределение в других тканях.

Высокая концентрация токсичных соединений в желудке будет указывать на оральный путь введения, хотя необходимо иметь в виду и другие пути попадания его в желудок.

Если моча недоступна для тестирования, то она может быть заменена экстрактом или фильтратом содержимого желудка. Лекарственный скрининг содержимого желудка недостаточен, чтобы определить все потенциальные токсиканты. Например, лекарственные (наркотические) средства, обычно применяемые внутривенно, при курении или ингаляционно, не могут проникнуть в желудок в детектируемых количествах, поэтому их обнаружение проводят ИХМ в крови или плазме.

Токсичные вещества, принятые за несколько часов до смерти, не всегда сохраняются в желудке. Некоторые вещества основного характера после всасывания в кровь будут диффундировать обратно в желудок и находиться там в ионизированном состоянии из-за кислой реакции среды. Результирующая концентрация токсиканта в содержимом желудка будет частично определяться значением p*K~a~* и концентрацией этого вещества в крови.

Результаты скрининга содержимого желудка должны быть сопоставлены с данными ИХМ, полученными при исследовании плазмы крови и стекловидного тела, или скрининга веществ основного характера в крови методом ГЖХ с АФД (см. гл. 5).

Вместо скрининга мочи (в случае если моча недоступна) проводят по определенной схеме исследование содержимого желудка, крови или гомогенатов тканей (в случае если кровь недоступна).

ИХМ можно применять для анализа негемолизированной и гемолизированной плазмы, посмертной цельной крови или стекловидного тела. Если результат ИХМ неудовлетворительный, то образец разбавляют равным объемом необходимого буфера, что бывает достаточно, чтобы сделать образец аналитически доступным.
При необходимости скрининг крови может быть осуществлен с помощью спектрофотометрии, причем гемоглобин и другие белки необходимо сначала осадить ацетоном, метанолом или ацетонитрилом. После такой обработки надосадочная жидкость может быть исследована с помощью соответствующих калибраторов.

Применительно к образцам крови, плазмы, стекловидного тела ИХМ должны быть калиброваны по низкой пороговой чувствительности, которые используются для скрининга мочи. Cut-off порядка 50 нг / мл (500 нг / мл для барбитуратов) дает некоторое количество ложноположительных результатов, которые вследствие перекрестного реагирования интересующих анализируемых веществ минимизируют получение ложноотрицательных результатов (см. начало главы). Все положительные результаты, полученные с помощью ИХМ, должны быть подтверждены и отражены в конечном отчете. Если обстоятельства дела включают летальный исход, необходимо провести иммунохимические исследования на присутствие фенацетина и салицилатов.

ГЖХ-скрининг веществ основного характера крови более чувствителен, чем таковой содержимого желудка, но также и более трудоемок. ГЖХ-скрининг может быть включен в общий скрининг, особенно когда моча недоступна как объект или когда известно, что имела место интоксикация, но скрининг содержимого желудка дает отрицательный результат.

В тех случаях когда первоначальный хроматографический скрининг дает неидентифицированные пятна при ТСХ или неидентифицированные пики на хроматограмме (ГЖХ) в отсутствие нужных стандартных веществ сравнения, образец в дальнейшем может быть подвергнут скринингу методом ГХ-МС (см. гл. 5).

Для интерпретации результатов ХТА обязательно сопоставляются обстоятельства дела, результаты вскрытия, клинические данные (если возможно) и результаты исследования, а также информация о специфических физиологических реакциях, обусловленных действием того или иного токсиканта. Нарушение сердечного ритма, частота дыхания, размер зрачка и отсутствие узнавания, несохраненные рефлексы, конвульсии и некоторые другие предсмертные симптомы могут свидетельствовать о механизме токсичности подозреваемого агента и указывать на некоторые токсиканты среди большого числа возможных (см. гл. 6–10).

Результаты вскрытия помогают химико-токсикологическому исследованию. Состояние слизистой оболочки желудка или пищевода может подтвердить или исключить действие едких обжигающих токсикантов. Наличие в венозных сосудах алой крови может указать на возможное отравление угарным газом (CO). Отек легких может указать на предсмертное угнетение дыхания, некроз печени — в первую очередь на отравление фенацетином или парацетамолом, бледной поганкой среди других токсичных агентов, обладающих гепатотоксичностью. Следы инъекций позволяют предположить передозировку вещества при внутривенном введении.

При ненаправленном СХА на «общее неизвестное», т. е. когда химическая природа токсикантов неизвестна, должны соблюдаться следующие правила.

* Необходимо провести обширный скрининг для охвата максимально возможного количества групп токсикантов всеми доступными методами. * Определение содержания алкоголя в крови и глазной жидкости должно быть проведено раньше анализа (или одновременно с ним) на другие соединения (см. п. 7.1). * Определение алкоголя в крови предпочтительнее провести методом ГЖХ с использованием внутреннего стандарта; это не исключает возможное подтверждение другими методами (см. п. 7.1). * Если есть подозрение на отравление оксидом углерода(II), то исследование на этот токсикант необходимо провести перед общим скринингом (см. п. 7.3). * В тех случаях когда отбор образца и его количество лимитированы, необходимо особенно тщательно составить схему исследования и на ранней стадии ХТА использовать ИХМ (если доступно достаточное количество образца). * Найденные положительные результаты должны быть в большинстве случаев подтверждены другими независимыми методами. Когда размер образца лимитирован, дальнейшие этапы общего скрининга могут быть объединены в один этап, а не проводиться параллельно.

Специалист в области ХТА должен проанализировать результаты фармакологических и токсикологических исследований, возможность лекарственного отравления при передозировке, установить посмертные изменения токсичных агентов и анализируемых биообъектов.

В итоге своей работы эксперт надеется получить ответы на следующие вопросы.

* Какой химический агент был использован, когда и как? * Была ли доза использованного химического агента или комбинации агентов достаточной, чтобы вызвать летальный исход или повреждение здоровья? * Какие системы, органы или ткани являются поврежденными? * Существуют ли факты, свидетельствующие о том, что доза вещества была употреблена в терапевтических целях, с целью суицида или убийства? * Был ли умерший(ая) интоксицирован(а) во время инцидента, приведшего к летальному исходу? * Как интоксикация может быть объяснена присутствием конкретного токсичного агента? * Существует ли альтернативное объяснение полученных результатов? * Какие другие дополнительные исследования могли бы уточнить обстоятельства гибели или нанесения ущерба здоровью?

Когда химико-токсикологическое исследование завершено, полученные результаты суммируются в виде отчета — **акта судебно-химической экспертизы,** который представляется танатологу (судебно-медицинскому эксперту). В акте указывают имя умершего, если известно, или номер, ему присвоенный; подробное описание примененных методик; анализируемые биообъекты и химические агенты, обнаруженные в каждом образце; найденные концентрации этих веществ, занесенные в таблицы утвержденной формы. В акте также указывают вещества, в отношении которых были сделаны попытки их обнаружения, но которые обнаружены не были (особенно если в направлении содержалась просьба их обнаружить). Если были обнаружены какие-либо токсиканты, но их наличие не было подтверждено другими методами, то этот факт обязательно отражается в отчете (акте). Кроме того, сообщается любая информация о биообъекте, например дата и время отбора предсмертной крови (известны сложности при интерпретации результатов, связанные с посмертным перераспределением многих токсикантов), или какие-либо необычные факты, характеризующие биообъект. В отчете должно быть указано, по чьей инициативе был проведен отбор проб.

4.7. Обеспечение качества и надлежащая лабораторная практика

То, что не документировано, — не выполнялось!

Принцип надлежащей лабораторной практики

Значение многих работ в области ХТА снижается из-за отсутствия согласованной системы представления полученных результатов. Как правило, эксперт довольно редко имеет возможность осуществить детальное межлабораторное статистическое исследование, ограничиваясь лишь рядом повторных определений в своей лаборатории. Выполняя количественное определение, аналитик должен ответить на вопрос: когда и в какой части процесса обеспечивается самая высокая точность?

Для получения надежных результатов исследований необходимо иметь стандартные образцы и его эталонные растворы.

Стандартное вещество сравнения (первичный стандарт) — паспортизованный образец определяемого вещества высокой чистоты, служит для приготовления эталонных растворов вещества сравнения.

Эталонный раствор вещества сравнения — раствор стандартного вещества определенной концентрации в воде или органическом растворителе. Используют для калибровки приборов или аналитического контроля.

Рабочий раствор вещества сравнения – раствор, приготовленный разбавлением эталонных веществ сравнения. Используют для проведения контрольного опыта.

Контрольный образец (модельная смесь) – биологический образец с внесенным анализируемым веществом в известной концентрации.

Холостой образец – биологический образец, идентичный контрольному образцу по биологической матрице, но не содержащий исследуемого вещества.

Фон — искусственная интерференция каких-либо материалов в контрольном или аналитическом образце, которая может вызвать положительную или отрицательную ошибку.

Результаты обрабатывают по одному из методов: абсолютной градуировки, методом внутреннего стандарта, методом стандартной добавки.

Калибровку необходимо строить для каждого нового образца. При калибровке нужно также включать холостой образец. Для построения градуировочного графика необходимо иметь набор смесей анализируемого вещества в концентрациях, охватывающих исследуемый диапазон концентраций. Исскуственные смеси готовят из веществ с аттестованной степенью чистоты. Также должна быть известная погрешность определения искомого соединения в искусственных смесях выбранным методом исследования, т.е. методика приготовления искусственных смесей должна быть метрологически аттестована.

При проведении количественного определения токсиканта необходимо:

1) определение цели и выбор методов анализа;

2) разработка плана проведения исследования;

3) выбор методик аналитического метода, обеспечивающих надежность полученных результатов;

4) определение систематических ошибок измерения:

* с веществом сравнения; * независимым методом;

5) оценка случайных ошибок:

* определение внутрилабораторной воспроизводимости результатов; * определение межлабораторной воспроизводимости результатов;

6) адаптация условий проведения анализа в связи с полученными данными на этапах 4 и 5;

7) повторение, если потребуется, этапов 4 и 5;

8) выполнение и представление результатов анализов.

Обеспечение качества и надлежащая лабораторная практика (принципы GLP в работе современной лаборатории)

Надлежащая лабораторная практика (GLP) — это система мероприятий по обеспечению качества результатов анализов в лаборатории (организационный процесс и условия, в которых планируются, осуществляются, контролируются, регистрируются лабораторные исследования и представляются их результаты) (см. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ 33044-2014. Утвержден и введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 02.12.2009 № 544-ст). В мире такая система действует более 20 лет. В Евразийском экономическом союзе (ЕАЭС) единые правила GLP вступили в силу 6 мая 2017 г.

Контроль качества – это:

* неотъемлемая часть надлежащей лабораторной практики, которая обеспечивает контроль за качеством и надежностью результатов, получаемых в данной лаборатории; * система контроля качества служит поддержанию компетенции лаборатории на необходимом уровне; * система контроля качества предусматривает проведение мероприятий как внутри, так и за пределами лаборатории; * весь комплекс мероприятий надлежащей лабораторной практики должен присутствовать в лаборатории в печатном виде; * двумя самыми важными и взаимодополняющими друг друга в данной системе документами являются: руководство по качеству, отражающее все аспекты системы контроля качества; стандартные рабочие инструкции — подробные пошаговые инструкции по выполнению отдельных видов деятельности лаборатории.

Руководство по качеству

Руководство по качеству – это внутрилабораторный документ, регламентирующий административную, хозяйственную и научную стороны ее деятельности. Оно обеспечивает условия проведения лабораторных работ под надлежащим контролем и достижения поставленной цели при соблюдении всех требуемых нормативов и стандартов с тем, чтобы результаты работ могли быть приняты в качестве доказательства в ходе судебного процесса самого высокого уровня.

Руководство по качеству содержит следующие разделы:

1. Политика в области персонала лаборатории (обязанности) и организация работы в лаборатории.

2. Правила приема, учета, внутрилабораторного движения, хранения, возврата и уничтожения образцов.

3. Контрольные эталоны.

4. Материалы и реактивы.

5. Оборудование.

6. Оснащение лаборатории и условия работы.

7. Методы и процедуры.

8. Отчетность.

9. Жалобы и отклонения от нормы.

10. Методы проверки качества работы.

11. Меры по обеспечению безопасности лаборатории.

12. Аттестация и межлабораторные сравнительные испытания.

13. Аккредитация и сертификация.

Руководство по качеству предусматривает полное описание должностных обязанностей всех сотрудников. Должна быть предусмотрена по крайней мере одна должность сотрудника, ответственного за оценку качества результатов

работы.

Порядок работы с образцами.

Лаборатория должна иметь подробные инструкции о порядке приема, способах маркировки, регистрации и обработки материалов, поступающих на исследование, а также о порядке их последующего возвращения или уничтожения. Все представленные образцы должны быть тщательно упакованы, промаркированы, должны иметь сопроводительную документацию, выполненную по соответствующей форме. Принимать образцы должны специально выделенные сотрудники, каждый образец должен заноситься в систему регистрации. Вся сопроводительная документация по каждому из образцов хранится в соответствующем месте в лаборатории.

Отбор проб и образцов.

Главная задача при отборе проб – осуществление правильного и достоверного химического анализа. Отобранные образцы должны быть представительными. В завимости от задачи процедура отбора образцов может претерпевать изменения.

Особенности отбора биообразцов.

Необходимо обеспечивать соответствие изымаемого образца проверяемому объекту, обеспечивать их сохранность. Также необходимо избегать подмены или фальсификации образцов на всех стадиях проведения исследования.

Контрольные эталоны, материалы и реактивы.

В лаборатории должна вестись документация, касающаяся контрольных эталонов, контрольных проб или образцов и ступенек калибровок оборудования, которые необходимы в различных аналитических процедурах и методах. Стандарты должны быть получены из соответствующих национальных и международных стандартов с сопровождающей документацией. Контрольный эталон должен быть сертифицирован, должен соответствовать характеру исследований, проводимых в лаборатории, где должна быть документация, указывающая на источник и дату их приобретения и должен храниться в условиях, которые обеспечивают его сохранность и стабильность. Если контрольный эталон изготавливается в лаборатории, это также отражается в документации. Рекомендуется, чтобы лаборатория сама проверяла контрольный эталон на чистоту и состав путем сравнения этих показателей с ранее использованным эталоном. Калибраторы при анализе биологических проб должны иметь ту же биологическую матрицу, что и матрица исследуемых проб.

Контрольные пробы или образцы готовятся из эталонных материалов, либо приобретаются, либо получаются из фонда ранее исследованных проб. Используются для проверки правильности калибровки.

Ответственность за приобретение и содержание контрольных эталонов должна быть возложена на специально назначенного сотрудника, который должен вести регистр всех этих материалов.

Качество реактивов должно соответствовать требованиям лабораторных исследований. Все реактивы должны быть снабжены этикетками с информацией о дате получения, сроке годности, дате начала использования. В лаборатории необходимо вести тетрадь записей о приготовлении реактивов.

Оборудование.

Для контроля оборудования необходимы наличие в лаборатории инвентарной описи оборудования и ведение соответствующей документации, касающейся расположения, даты приобретения, данных об уходе за оборудованием, его техническом обслуживании и ремонте. Инструкции по эксплуатации должны находиться поблизости. Должен быть назначен ответственный за конкретное оборудование и в случае неисправности он должен быть немедленно оповещен. Оборудование должно быть выведено из эксплуатации до устранения неполадок.

Вследствие разнообразия используемого оборудования имеются конкретные требования к различным его видам с учетом специфики.

Оснащение лаборатории, условия работы и техника безопасности.

От того, с каким видом проб будет работать лаборатория, зависит ее оснащение, требования к площади, правилам хранения и техника безопасности. В соответствии с проектной нагрузкой лаборатория обеспечивается оборудованием и персоналом. При размещении оборудования следует учитывать последовательность приемки, хранения, предварительной обработки, анализа, удаления проб и образцов. Посуда, применяемая при исследовании токикантов с высокими концентрациями, должна использоваться отдельно от посуды, применяемой при работе со следовыми количествами в биологических пробах. Оборудование, чувствительное к окружающим условиям, должно размещаться в местах с ограниченным доступом.

При работе в лаборатории должны соблюдаться обычные санитарно-гигиенические требования. Это применение лабораторных перчаток, халатов, средств защиты глаз. В помещениях лаборатории не должен быть прием пищи и напитков. Пожарная безопасность – одно из основных требований при работе в химической лаборатории, включающее правила хранения воспламеняющихся растворов и реактивов, лаборатория должна быть оснащена средствами пожаротушения, должны быть назначены лица, ответственные за противопожарную безопасность, должны регулярно проводиться тренинги. Для обеспечения биологической безопасности при работе с биологическим материалом следует пользоваться средствами биологической защиты. Источником радиационной опасности могут служить радиоиммунологические исследования (изотоп ^127^I~2~ или тритий), а также электронно-захватные детекторы (ЭЗД) в ГХ (обычно ^63^Ni). Необходимо соблюдать правила по использованию и утилизации радиоактивных материалов. Персонал должен носить дозиметры для радиационного контроля дозы облучения.

Отчетность.

Система качества проведения работ должна предусматривать следующие требования к ведению отчетности в лаборатории:

* содержание аналитического отчета; * терминология; * процедура отчетности; * конфиденциальность документов; * система хранения и поиска документов.

Аккредитация и сертификация.

Аккредитация – процедура, посредством которой орган по аккредитации официально признает правомочность лаборатории или лица выполнять конкретные работы.

Сертификация – процедура, посредством которой орган по сертификации официально признает, что лицо или продукция соответствуют определенным техническим условиям.

Аккредитация и сертификация внешними организациями являются целью разработки обеспечения качества.

Основные составляющие системы GLP, согласно международным правилам.

1. Персональная ответственность за результаты анализов.

2. Независимое (от лабаоратории) подразделение по контролю качества текущей работы лаборатории.

3. Валидация оборудования, программного обеспечения, методик выполнения измерений и результатов анализа.

4. Внутренний аудит качества работы лаборатории.

5. Внешний аудит качества работы лаборатории.

Валидация – это организация такой документальной проверки, которая предоставляет высокую степень уверенности в том, что выбранный процесс проверки воспроизводимо обеспечивает получение достоверных сведений о соответствии продукции заранее определенной спецификации на эту продукцию. Валидация – доказательство того, что любые процедура, процесс, оборудование, материал, система, вид деятельности действительно соответствуют ожидаемым результатам. Это проверка данных на достоверность или соответствие установленным стандартам, правилам или договоренностям. Валидация включает в себя проверку

работоспособности оборудования, правильности получаемых результатов. Валидация компьютеризированной системы – демонстрация того, что компьютеризированная система соответствует своему назначению.

Валидация аналитических методик – установленный процесс проверки метрологических характеристик аналитического метода на соответствие своему предназначению, проводимый в лабораторных условиях.

Термин «квалификация» — процесс проверки и предоставления доказательств того, что оборудование работает правильно и его работа приводит к ожидаемым результатам. Квалификация является частью процесса валидации и всегда относится к определенному продукту, товару, персоналу, услуге и пр.

Прибор не может выдавать достоверные результаты, если не проведены или не проводятся надлежащим образом следующие этапы его квалификации:

* DQ (Desigh Qualification) — проверка соответствия оборудования стоящей аналитической задаче. Определение требует спецификации на оборудование. * IQ (Installation Qualification) — проверка правильности установки оборудования, проведенной в надлежащих условиях. * OQ (Operation Qualification) — проверка того, что прибор функционирует в соответствии с требуемой спецификацией (аналог его метрологической аттестации или поверке). * PQ (Performance Qualification) — проверка того, что прибор функционирует в соответствии с требуемой спецификацией в процессе эксплуатации для конкретной методики.

Основными объектами валидации и квалификации в лаборатории являются:

* квалификация аналитического оборудования; * валидация программного обеспечения и компьютерных систем; * валидация результатов анализа; * валидация аналитических систем как единого целого (оборудование + методики); * валидация методик выполнения измерений; * квалификация стандартных образцов и стандартных материалов; * квалификация персонала лаборатории.

Валидация не гарантирует от ошибок, но обеспечивает высокую степень уверенности в достоверности результатов.

Глава 5. Методы определения токсикантов

5.1. Введение

Трудных наук нет, есть
только трудное изложение,
то есть непереваримое.

Александр Иванович Герцен (1812–1870),
русский публицист-революционер,
писатель, педагог, философ

Труд создал человека, а человек – трудности.

Антон Лигов (Леонид Исаакович Генцлер)
(1924–1995), советский педагог, писатель

ХТА выполняют с использованием подходящих методов, возможности которых соответствуют решаемой задаче. Выбор метода определения токсиканта и проведение ХТА невозможно без знания основ аналитической и органической химии, физики и математики.

Информационная эффективность методов анализа. Качество результата определения оценивается с точки зрения его погрешностей, при этом должны быть охарактеризованы надежность, качество этой погрешности. **Согласно современным нормативным документам, необходимо учитывать следующие параметры качества анализа:**

* качество пробы и пробоподготовки; * предел обнаружения и предел определения; * чувствительность; * селективность (специфичность); * линейную область градуировочной зависимости; * точность; * прецизионность

в условиях воспроизводимости и сходимости; * правильность (мера правильности); * робастость — устойчивость результатов к небольшим колебаниям внешних условий; * затраты и стоимость одного анализа.

Все многообразие характеристик можно свести к одному интегрирующему показателю в численной мере. Общий интерес представляют такие параметры, как время, необходимое для выполнения анализа, точность получаемых результатов и разрешающая способность метода. Аппарат *хемометрики* — пограничной области науки, в которую входят статистика, аналитическая химия и методы вычислительной математики — позволяет подойти к решению проблемы с точки зрения теории информации исходя из уравнения Шеннона. Так, в качественном анализе возможны только два вывода: компонент присутствует или отсутствует. Поэтому в качественном анализе максимальное получаемое количество информации *H*~макс~ = log~2~2 = 1 составит 1 бит (от binary digit — двоичная единица измерения количества информации по Шеннону).

В количественном анализе учитывают конкретные особенности метода анализа, например время выполнения определения, разрешающую способность метода, рабочий диапазон измеряемых концентраций и др. Поэтому объем информации *I*, предоставляемой методом анализа, может быть оценен по следующей более сложной формуле:

$$I = \frac{t}{t_{\text{A}}} \frac{z_{\text{макс}} - z_{\text{мин}}}{\Delta z_{1/2}} \log_2 \frac{(x_{\text{макс}} - x_{\text{мин}})\sqrt{n_{\text{A}}}}{s_x \sqrt{2\pi e}} \text{ бит},$$

где *t* — имеющееся в распоряжении аналитика время; *t*~A~ — время, необходимое для выполнения анализа данным методом (при *n*~A~ параллельных); *z*~макс~, *z*~мин~ — диапазон измеряемых свойств; *z*~1 / 2~ — полуширина сигнала; *x*~макс~, *x*~мин~ — интервал измеряемых концентраций; *s*~*x*~ — случайная погрешность; log~2~ — двоичный логарифм.

Таким образом, если качественный анализ способен предоставить только 1 бит информации, то количественные химические методы, например гравиметрия и титриметрия, — 1–2 бит, атомный эмиссионный анализ и рентгеновская спектрометрия — уже сотни бит, а МС — тысячи бит информации. Это объясняется тем, что в современных приборах велик диапазон измеряемых сигналов и диапазон измеряемых содержаний — до 5–6, а точность очень высокая.

При всесторонней оценке метода анализа немалую роль играет и стоимость, которая складывается из всех действительных затрат (амортизация аппаратуры, стоимость материалов, энергии, заработная плата и т.д.). Поэтому отношение количества полученной информации к затратам может характеризовать рентабельность метода анализа. С точки зрения рассмотренного информационного подхода большему диапазону определяемого содержания при прочих равных условиях отвечает и бóльшая информационная эффективность метода. Физико-химические методы анализа имеют принципиально более низкие пределы обнаружения и несравненно более эффективны, чем классические химические методы (гравиметрия и титриметрия). Информационная мощь таких гибридных методов, как ГХ-МС или ВЭЖХ-МС-ЯМР (см. ниже), имеет значительные преимущества при выполнении сравнительных исследований большого числа определяемых аналитов.

5.2. Иммунохимические методы определения токсикантов

Науку нередко сравнивают с искусством…
и тут и там необходимо озарение…
и еще необходима образность…
Однако образность, подача самого главного в одном сконцентрированном аккорде, столь свойственная импрессионизму, – нередкое качество лучших научных экспериментов, обобщений или теорий.

Рем Викторович Петров (род. 1930),
выдающийся советский и российский иммунолог,
академик РАН, Герой Социалистического труда (1992)

5.2.1. Классификация и сущность иммунохимических методов

Отличить свое от чужого — главное условие жизни.

Фрэнк Макфарлейн Бернет (1899–1985),
австралийский вирусолог-иммунолог,
лауреат Нобелевской премии
по физиологии и медицине (1960)

Теория селекции клонов Ф. М. Бернета дала ответ на вопрос, почему, попадая в организм, антиген вызывает синтез именно тех антител, которые специфично реагируют только с ним.

Антиген — это вещество, способное вызывать биосинтез специфических антител. В роли антигенов обычно выступают высокомолекулярные вещества — белки, полисахариды и т.д. Для характеристики антигена используют такие понятия, как иммуногенность и антигенность. *Иммуногенность* — это способность антигена вызывать иммунный ответ, *антигенность* — показатель, характеризующий способность антигена индуцировать синтез антител в организме. *Антитела* — специфические белки-иммуноглобулины, продуцируемые лимфоцитами млекопитающих в ответ на инородные вещества, введенные в организм (антигены). Функциональную химическую группу на поверхности антигена, взаимодействующую с активным центром антитела, называют *антигенной детерминантой.* На поверхности антигена может находиться несколько антигенных детерминант различной структуры.

На протяжении нескольких десятилетий для обнаружения вирусов, токсинов, гормонов, лекарственных препаратов, наркотиков, экотоксикантов в биосредах человека и животных успешно применяют ИХМ.

Антитела являются ключевым компонентом всех ИХМ, так как именно они в значительной степени определяют чувствительность и специфичность анализа. Антитела характеризуются наличием в своей структуре специфических антигенсвязывающих центров, которые способны с высокой специфичностью распознавать молекулы антигена и взаимодействовать с ними. Этот биологический феномен был использован для введения определяемых веществ гиперчувствительным животным с последующим сбором сыворотки крови, содержащей специфичные к этим соединениям антитела. Белки сыворотки крови животных, которые специфически связываются с антигеном, подразделяют на пять классов (*изотипов*): *IgG, IgM, IgA, IgE и IgD***.** Иммуноглобулин *IgG,* основной иммуноглобулин сыворотки здорового человека (рис. 5-1), это мономерная форма с двумя *легкими* пептидными цепями и с двумя *тяжелыми* пептидными цепями, связанными дисульфидными мостиками (молекулярная масса 150 000 Д). Часть молекулы иммуноглобулина, называемая *Fab*-областью, содержит пептидную последовательность, представляющую собой *область распознавания (связывания) антигена*. Антитела специфически связывают антигены, основываясь на молекулярной структуре антигена и пространственной ориентации молекул.

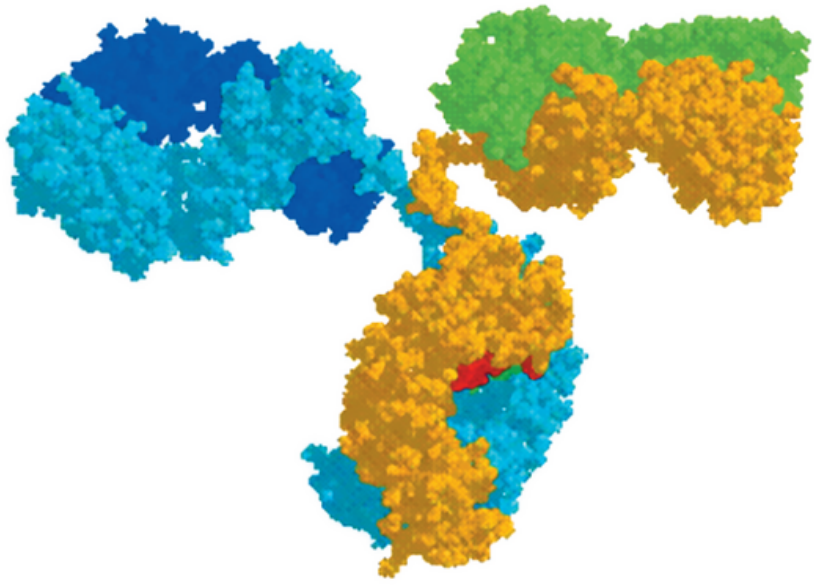


Рис. 5-1. IgG — мономерная форма с двумя легкими пептидными цепями (синий и зеленый цвета) и с двумя тяжелыми пептидными цепями (голубой и песочный цвета), связанными дисульфидными мостиками. *Fab*-область отмечена красным цветом (пояснения в тексте).

Во взаимодействии с антигеном принимает участие большое число аминокислотных остатков антитела (полицентровая модель структурной организации антигенсвязывающих центров). Для различных систем иммунных комплексов участок связывания может иметь форму неглубокой выемки, клино- или конусообразной полости.

Малые молекулы (молекулярная масса менее 2000 Д) не являются антигенными, поэтому необходимо «обмануть» иммунную систему для стимулирования продукции специфических антител. Для этого перед введением в организм животного малую молекулу связывают с большой — антигенным компонентом. Низкомолекулярные вещества, не способные вызывать образование антител, но приобретающие иммуногенные свойства после конъюгирования с высокомолекулярными носителями, называют *гаптенами*. После получения *иммуногена* (антигена, индуцирующего иммунный ответ) проводят иммунизацию животного. Животное будет продуцировать антитела, специфичные к малой молекуле. В зависимости от типа антител используют разных животных и разные методы иммунизации.

Использование антител как природного инструмента распознавания и выделения анализируемого вещества имеет ряд преимуществ. Антитела легкодоступны, могут быть произведены в любом количестве и при небольших затратах. Для проведения ИХМ требуется настолько малое количество антител, что иммунной сыворотки, например, от одного кролика достаточно для определения аналита более чем в 5 млн проб.

ИХМ основаны на связывании определяемого соединения со специфическими антителами, полученными специально на данный аналит, и дальнейшей детекции образовавшихся комплексов с помощью различных меток и методов определения.

Реакциям *антиген–антитело* свойственна высокая специфичность. Однако если антиген А имеет общие эпитопы с антигеном Б, часть антител, специфичных к А, будет реагировать также с Б. Этот феномен назван *перекрестной реактивностью*, или *кросс-реакцией* (см. ниже).

В основе ИХМ анализа лежит обратимое нековалентное связывание антигена со специфическими антителами. Эта реакция подчиняется закону действующих масс:

$$\underset{\text{(свободные компоненты)}}{Ag + Ab} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\longrightarrow}} \underset{\text{(связанная фракция)}}{Ag : Ab},$$

где *Ag* — антиген; *Ab* — специфические антитела; *k*~1~ — константа скорости образования комплекса, *k*~2~ — константа скорости диссоциации комплекса; *Ag : Ab* — комплекс антиген–антитело.

Реакция обычно протекает до установления в системе равновесия, когда концентрации антигена, присутствующего в свободной и связанной фракциях, остаются постоянными. Детекцию образовавшегося комплекса антиген–антитело осуществляют, вводя метку в один из исходных компонентов системы. В иммуноанализе могут применяться различные метки, обеспечивающие относительно простую и быструю детекцию, а также необходимую для анализа чувствительность. Наиболее удобными для иммуноанализа оказались изотопные, ферментные, флуоресцентные и парамагнитные метки.

ИХМ анализа классифицируют исходя из сущности метода, применяемых стандартных препаратов, характеристик антител, типов применяемой метки, системы детектирования и др. (табл. 5-1). Наиболее распространена классификация по способу детектирования. В этом случае приведены названия методов, принятые в иммунохимии.

Широкое распространение среди ИХМ получили ИФА и флуоресцентный иммуноанализ (ФИА), в частности поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА).

В 1977 г. американский биофизик Розалин Ялоу получила Нобелевскую премию в области медицины за развитие и совершенствование аналитического метода, основанного на принципе РИА. В РИА образцы (или стандарты) инкубируются с небольшим постоянным количеством определяемого вещества, меченного радиоактивным изотопом (в качестве метки применяют тритий, ^14^C, ^125^I) и постоянным количеством антисыворотки. После установления в системе равновесия свободную и связанную фракцию разделяют с помощью какого-либо

физического, химического или иммунологического метода, а затем измеряют радиоактивность в одной (или обеих) фракциях.

Таблица 5-1. Способы классификации иммунохимического метода

По сущности метода	*Конкурентное связывание*: одна антигенная детерминанта на определяемом веществе; анализ выполняется в условиях ограниченного количества реагента. *Неконкурентное связывание*: на определяемом веществе должны быть две неперекрывающиеся антигенные детерминанты; анализ выполняется в условиях избытка реагента. *Неравновесный режим*: используется одна антигенная детерминанта; строго контролируемый избыток реагента
По применению стандартных препаратов	В качестве антигенов на твердой фазе; для получения антител; для определения выделенных гаптенов
По характеристике используемых антител	
По типу применяемой метки	Частицы (эритроциты, латекс). Золи металлов (коллоидное золото). Радионкулиды (^125^I). Ферменты, кофакторы (пероксидаза хрена, оксидазы). Потенциальные люминофоры (эфиры акридина, флуоресцеин). Электрохимически активные вещества (диметиламинометилферроцен)
По способу детектирования	Радиоактивность (РИА). Ферментативная активность (ИФА). Интенсивность флуоресценции (ПФИА). Интенсивность люминесценции (ЛИА). Параметры турбодиаметрии (иммуноанализ с использованием «частиц» и иммунодиффузии) Электрический сигнал (иммуносенсорные методы). Показатели преломления света (нефелометрические иммунометоды). Параметры атомных спектров поглощения (металлоиммуноанализ). Цитолиз бактериофагов (вироиммуноанализ) Другие
По технике выполнения	Жидкофазные и твердофазные методы. Ручные, полуавтоматические, автоматические методы. Методы с использованием экстракции ИХМ, используемые во внелабораторных условиях (тест-полоски)

Примечание. РИА — радиоиммунный анализ; ИФА — иммуноферментный анализ; ПФИА — поляризационный флуоресцентный иммуноанализ; ЛИА — люминесцентный иммуноанализ; ИХМ — иммунохимический метод.

Достоинства РИА:

* высокая точность; * специфичность; * экспрессность (результаты могут быть получены уже через 1 ч после поступления образцов); * малый объем образца, необходимого для анализа.

Недостатки РИА:

* необходимость работы с потенциально опасными радиоактивными изотопами; * меченые реагенты имеют относительно короткий период полураспада, что осложняет их производство, хранение и транспортировку; * использование дорогостоящих счетчиков для измерения радиоактивности; * разделение свободной и связанной с антителами фракций антигена.

5.2.2. Иммуноферментные методы анализа

Наука начинается с тех пор,
как начинают измерять.
Точная наука немыслима без меры.

Дмитрий Иванович Менделеев (1834–1907), великий русский ученый-энциклопедист, автор фундаментальных исследований по химии, физике, метрологии, геологии, экономике, метеорологии и ряда других наук. Открыл фундаментальный закон мироздания – периодический закон химических элементов.

К настоящему времени разработаны многие технологии (варианты) ИФА, которые объединяет использование ферментов в качестве метки и возможность их детектирования в растворе с помощью соответствующих субстратных систем на уровне до 10^–15^ М.

Сущность ИФА связана с двумя научными положениями. Первое заключается в том, что ковалентно или нековалентно связанные с твердой основой как энзимы, так и антитела способны сохранять свою функциональную активность, т. е. энзим способен расщеплять субстрат, а антитело — связывать антиген. Второе положение базируется на возможности создания комплекса *антитело–фермент* в виде конъюгата, сохраняющего свою биологическую активность в растворе, при этом конъюгаты характеризуются высочайшей специфичностью и чувствительностью.

Первой стадией в любом варианте ИФА является узнавание анализируемого соединения специфичным к нему антителом. *Вторая стадия* — это формирование связи меченного ферментом соединения со специфическим комплексом или свободными центрами связывания. *Третья стадия* — трансформация ферментной метки в соответствующий сигнал, измеряемый различными физико-химическими методами.

Существуют различные подходы к классификации иммуноферментных методов:

* по соотношению концентраций антигена и паратоповПаратоп (активный антигенсвязывающий центр) — часть вариабельной области антитела, контактирующая с антигеном, — располагается на N-конце Fab-фрагментов (см. рис. 5-1).; * по типу определяемого комплекса (детекция образованного иммунного комплекса или свободных паратопов); * по меченому соединению (антиген или антитело); * по характеру стадии иммунохимического распознавания (образование иммунного комплекса на твердой фазе или в растворе и последующее его отделение при помощи иммобилизованного реагента); * по числу реагентов, участвующих на стадии образования иммунного комплекса (неконкурентные — участвуют антиген и антитела, конкурентные — участвуют антиген, меченый антиген и антитела).

На рис. 5-2 представлена классификация методов ИФА, предложенная Б. Б. Дзантиевым и А. П. Осиповым (1987).

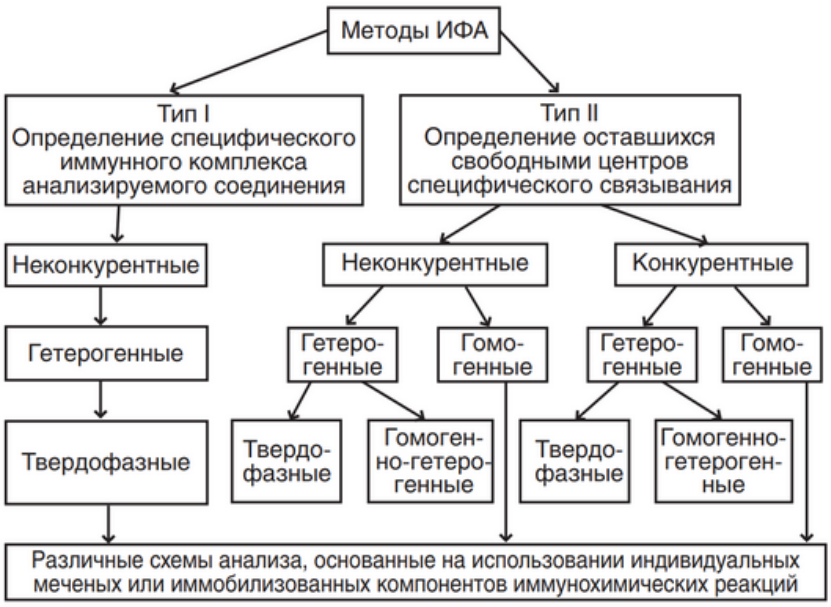


Рис. 5-2. Классификация методов ИФА

Принцип конкурентного метода состоит в конкурентном взаимодействии меченого антигена и определяемого вещества за ограниченное число центров связывания специфических антител (рис. 5-3).

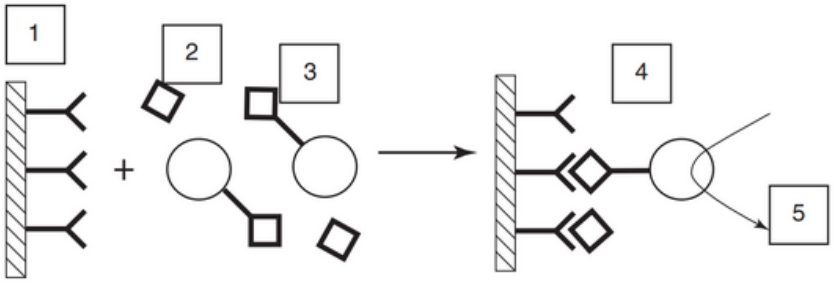


Рис. 5-3. Принцип одностадийного конкурентного иммуноферментного анализа: 1 — иммобилизованные антитела; 2 — анализируемый образец; 3 — конъюгат антигена с ферментом пероксидазой (Е); 4 — иммобилизованные иммунные комплексы с меченым антигеном; 5 — субстратная реакция

Необходимым условием конкурентного метода является недостаток специфических центров связывания по отношению к суммарной концентрации анализируемого соединения и его аналога, так как в противном случае каждый процесс образования специфического комплекса может проходить независимо друг от друга, а следовательно, определяемая концентрация метки не будет зависеть от концентрации анализируемого соединения.

В соответствии с типом реакций, проводимых на каждой из иммунохимических стадий, методы можно разделить на две группы: гомогенные и гетерогенные (см. рис. 5-2). Если в ходе анализа все стадии, включая ферментативную, проходят в растворе, то метод является *гомогенным*. В нем отсутствует стадия разделения иммунохимических комплексов и свободных компонентов. Определение концентрации анализируемого соединения основано на эффекте изменения каталитической активности фермента-метки, возникающем при комплексообразовании с исследуемым лигандом или центрами специфического связывания.

Для проведения *гетерогенного* ИФА один из компонентов иммунной реакции обычно иммобилизуют на твердой фазе с целью разделения связанной и свободной фракций антигена. Основным носителем являются 96-луночные полистирольные планшеты, а также полистирольные сферы, магнитные частицы, модифицированные стеклянные трубки, за счет которых увеличиваются поверхность и сорбционная емкость твердой фазы и тем самым несколько повышается чувствительность ИФА. Гетерогенный ИФА дает возможность эффективно разделять компоненты аналитической системы перед стадией определения концентрации ферментной метки.

На рис. 5-4 представлена схема твердофазного (гетерогенного) ИФА.

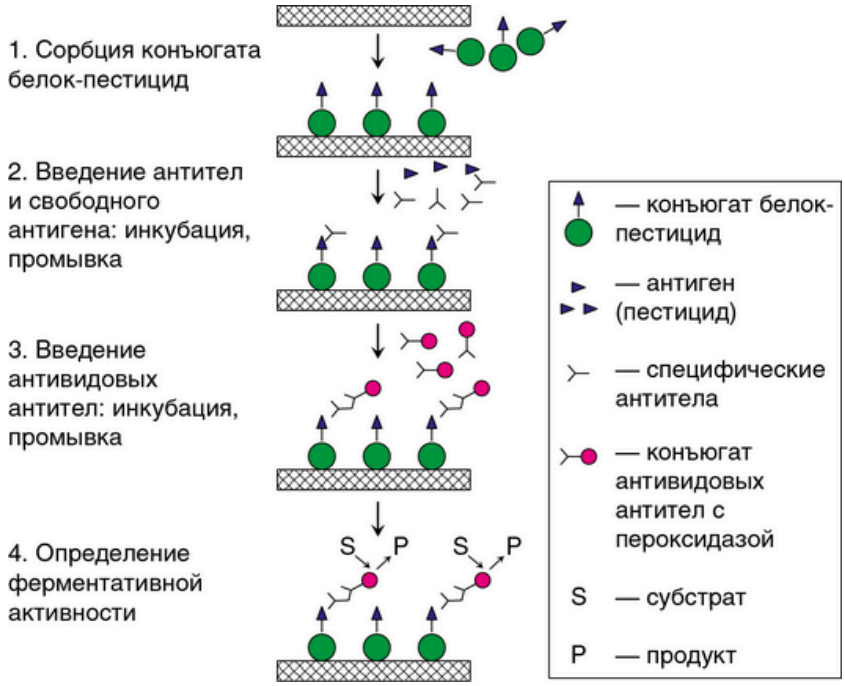


Рис. 5-4. Схема твердофазного (гетерогенного) иммуноферментного анализа (например, определение пестицида)

Непрямой способ ИФА (так называемый indirect ELISA) является одним из самых распространенных. В этом способе ИФА используют меченые вторичные антитела — антивидовые антитела, полученные к иммуноглобулинам соответствующего типа, и иммобилизованный на твердой фазе антиген (рис. 5-5, *а*). В ряде случаев прямая адсорбция низкомолекулярного антигена на поверхности полистирольных планшетов невозможна или нежелательна, поэтому иммобилизацию проводят через макромолекулярный белок-носитель, который впоследствии прочно связывается с твердой фазой. Для этого предварительно получают конъюгат белка-носителя, ковалентно связанного с гаптеном. При синтезе конъюгата белок — определяемое вещество следует избегать модификации групп, образующих антигенную детерминанту. Кроме того, для снижения неспецифических взаимодействий необходимо использовать белок и сшивающий агент, отличные от тех, которые применяли при синтезе иммуногена.

Достоинством такой схемы является возможность устранения влияния различных веществ, содержащихся в образце, на каталитические свойства ферментной метки, поскольку анализируемый образец и меченый реагент вводятся в систему на разных стадиях. Однако такая схема анализа усложняет определение аналита по сравнению с прямым методом ИФА из-за введения дополнительных стадий.

В прямом способе проведения ИФА (direct ELISA) антитела иммобилизованы на твердой фазе, а ферментная метка вводится в антиген (рис. 5-5, *б*). По этой схеме определяемое вещество и меченый антиген добавляют к иммобилизованым антителам и после инкубации и отмывки носителя от несвязавшихся компонентов регистрируют образование иммунного комплекса по ферментативной активности (на твердой фазе), которая обратно пропорциональна концентрации определяемого антигена. Преимуществом данной схемы является небольшое число стадий, что позволяет легко автоматизировать анализ. К недостаткам схемы относятся сложность и неуниверсальность методов синтеза ферментных конъюгатов, а также возможное влияние компонентов образца на активность фермента.

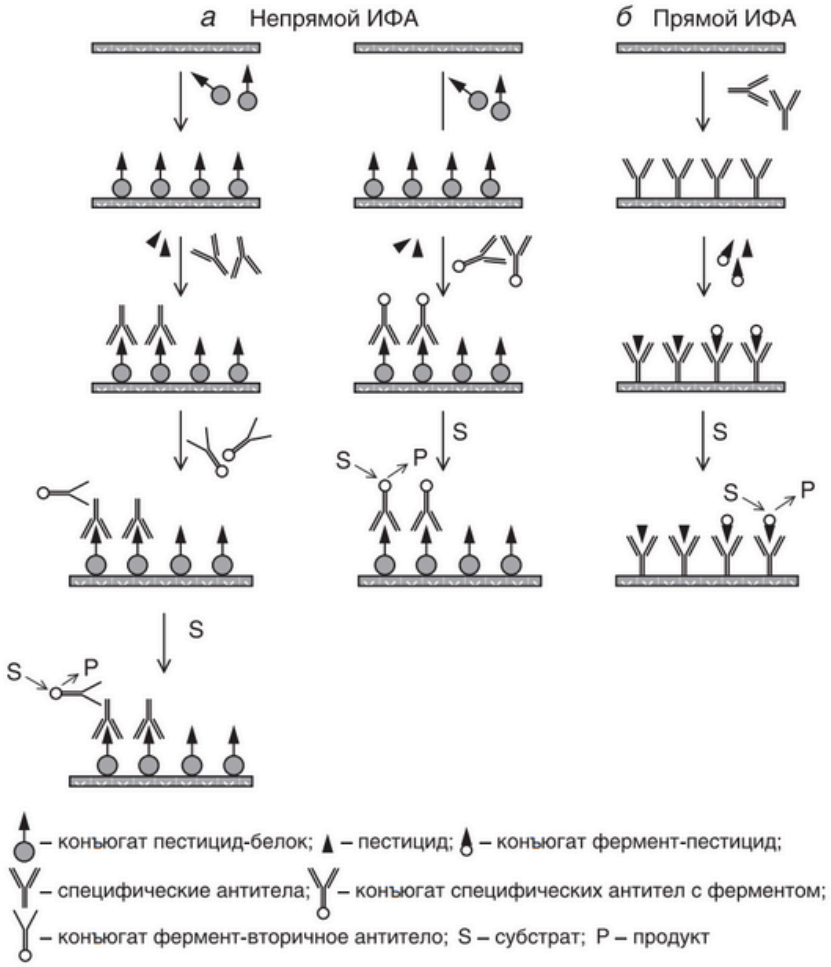


Рис. 5-5. Непрямой (*а*) и прямой (*б*) методы твердофазного ИФА (пояснения в тексте)

В качестве ферментной метки обычно используют пероксидазу, реже — щелочную фосфатазу, иногда — другие ферменты, например β-галактозидазу или глюкозооксидазу. В ИФА применяют различные виды детектирования ферментов, наиболее распространены спектрофотометрический, хемолюминесцентный и флуоресцентный.

Существует несколько технологий ИФА: ELISA (enzyme linked immunoadsorbent assay) — метод определения с помощью иммуносорбентов, связанных с ферментами; EIA (enzyme immunoassay) — метод на основе иммуноферментного определения; EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique) — способ, основанный на связи с ферментами, и др. (см. ниже). Первые две модификации (ELISA и EIA) — это методы гетерогенного или твердофазного ИФА, а третья (EMIT) является гомогенным ИФА.

Выбор технологии ИФА зависит от конкретной прикладной задачи, на решение которой будет направлен этот анализ. В экологическом мониторинге часто необходимо установить лишь факт наличия или отсутствия загрязняющих веществ в образцах, причем за довольно короткое время. В других случаях важно определить низкую концентрацию веществ в образцах с высокой точностью, тогда как продолжительность определения не всегда существенна.

После выбора технологии ИФА токсиканта проводят тестирование полученных иммунореагентов (антител и гаптенов) как в неконкурентных (в отсутствие определяемого соединения), так и в конкурентных условиях, выбирают комбинации иммунореагентов, которые отвечают поставленным перед иммуноанализом задачам. Затем проводят оптимизацию методики, принимая во внимание следующие параметры:

* формат анализа; * систему детекции аналитического сигнала; * определяемые концентрации антител и гаптена; * время инкубации и/ или прединкубации; * последовательное или одновременное внесение реагентов; * влияние блокирующих агентов; * влияние pH и ионной силы буферов; * температурный режим проведения определения.

В дальнейшем изучают специфичность методики и определяют ее метрологические характеристики. На следующем этапе исследуют влияние компонентов матрицы тех реальных объектов, в которых планируется проводить

определение аналита. Для этого сравнивают градуировочные графики, полученные для буфера и образца, не содержащего определяемое вещество. Все параметры должны быть подобраны таким образом, чтобы обеспечивать максимальную чувствительность определения при сохранении прецизионности в условиях воспроизводимости и сходимости результатов.

Специфичность и чувствительность любого иммуноанализа в большой степени определяются качеством специфических антител. Тем не менее структура меченого соединения (трейсера) во многих случаях оказывает заметное влияние на аналитические характеристики ИФА.

ИФА может быть легко автоматизирован, что крайне важно для обследования больших групп людей и экологического мониторинга. Метод нетрудоемкий и не требует высокой подготовки персонала. Твердофазный ИФА используют для определения широкого спектра веществ: наркотиков, гормонов, онкомаркеров, лекарственных препаратов в крови больного (мониторинг лекарственных препаратов), пестицидов, бактерий, вирусов и антител к ним. Благодаря невысокой стоимости и экологической безопасности метода лабораторные исследования перешли в разряд стандартных, рутинных анализов.

Однако технологии ИФА имеют и некоторые отрицательные стороны, к которым относятся возможность неспецифического связывания компонентов с носителем, значительное время анализа из-за длительности реакции антиген–антитело, многостадийность (ряд стадий пипетирования и промывок), а также существенное влияние неоднородности сорбционных свойств полимерных носителей на результаты анализа. Поэтому в настоящее время разрабатываются новые *безразделительные (гомогенные) методы иммуноанализа,* которые позволяют существенно повысить производительность анализа и реализовать высокопропускной скрининг — High-throughput screening. Для определения низкомолекулярных физиологически активных веществ одним из перспективных методов такого анализа является ПФИА.

5.2.3. Принципы поляризационного флуороиммуноанализа

Имей больше, чем показываешь,
говори меньше, чем знаешь.

Уильям Шекспир (1564–1616), великий английский драматург, поэт и актер, один из лучших драматургов мира

Физические основы поляризации флуоресценции.

Метод ПФИА простой в исполнении, относительно точный и экспрессный из-за минимального числа этапов пипетирования, большой скорости реакции связывания (иммунные комплексы образуются в однофазной системе) и отсутствия вариаций аналитического сигнала, наблюдаемых из-за неоднородности твердой фазы в методиках ИФА.

ПФИА основан на конкуренции определяемого антигена и трейсера за ограниченное количество центров связывания антител и измерении степени поляризации реакционной смеси:

Ab + Ag + AgF

Ag : Ab + AgF : Ab,

где *Ab* — антитела; *Ag* — антиген; *AgF* — меченый антиген; *Ag : Ab* — иммунный комплекс антигена с антителами, *AgF : Ab* — иммунный комплекс меченого антигена с антителами. Существует равновесие между *AgF* (константа скорости связывания с *Ab* – *k*~1~) и комплексом *AgF : Ab*, диссоциирующим с константой скорости *k*~2~.

Константа аффинности определяется следующим образом:

$$K_{af} = k_1 / k_2.$$

Чем выше концентрация определяемого антигена в пробе, тем в большей степени меченый антиген в реакционной смеси будет в свободном состоянии и *тем ниже значение поляризации флуоресценции.*

Метод ПФИА является гомогенным, не требует механического разделения образовавшихся соединений и позволяет определять концентрацию антигена в течение нескольких минут.

Преимущества и недостатки ПФИА. Метод ПФИА имеет много преимуществ, присущих ИХМ: универсальность применения для определения низкомолекулярных веществ (для многих из которых уже получены специфические антитела), возможность определять как одно соединение, так и группу соединений в зависимости от специфичности используемых антител, высокую чувствительность и правильность определения и др.

Более того, у ПФИА есть уникальные особенности, которые присущи только этому методу, основанному на использовании в качестве метки флуорофора (чаще всего флуоресцеина) и измерении поляризации флуоресценции в качестве аналитического сигнала (табл. 5-2).

Таблица 5-2. Преимущества и недостатки ПФИА

Преимущество	**Примечание**	**Недостаток**	**Примечание**
Гомогенный метод	Нет необходимости в стадиях: разделения связанной и свободной фракций антител, промывки и др.	Чувствительность ПФИА ниже, чем чувствительность других ИХМ	Чувствительность ПФИА ниже на 2–3 порядка, чем чувствительность ИФА
Экспрессный метод	Время анализа лимитируется только временем пипетирования	Сильное влияние матричного эффекта образца	Гомогенный безразделительный метод, поэтому наблюдается матричный эффект образца
Хорошая воспроизводимость результатов измерений. Коэффициент вариации определений не превышает 3–5%	Значение поляризации флуоресценции — относительный и безразмерный параметр, который сглаживает колебания в ошибках измерения прибора	Определяются только низкомолекулярные вещества (с использованием флуоресцентных меток)	В качестве метки в ПФИА часто используют флуоресцеин (рис. 5-6)
Флуоресцентные метки (трейсеры) стабильны при хранении в течение многих лет	Трейсеры довольно легко могут быть синтезированы	Необходим специальный прибор	–
Метод может быть автоматизирован	Фирма Abbott создала анализатор TDx (полностью автоматизированный). В настоящее время подобного типа анализаторы широко используют в диагностических лабораториях для рутинных анализов	–	–

История и пути развития ПФИА

Указанные недостатки успешно устраняются, развиваются новые направления ПФИА (однореагентный ПФИА, ПФИА в системе остановленной струи, ПФИА в органических растворителях), создаются новые приборы, используются новые метки. Среди новейших разработок — определение токсинов в пищевых продуктах: зераленона методом ПФИА и паклитаксила методом, аналогичным ПФИА, но с использованием в качестве связывающего агента не антител, а белка тубулина (см. гл. 10).

Техника эксперимента метода ПФИА

Синтез меченых флуоресцеином антигенов (трейсеров). Чаще всего для ПФИА используют в качестве метки флуоресцеин, поэтому многие серийно выпускаемые приборы для измерения поляризации флуоресценции оснащаются фиксированными светофильтрами, специально предназначенными для работы с флуоресцеином, и имеют длину волны возбуждения и эмиссии, близкую к флуоресцеину (492 и 520 нм соответственно).

Карбоксильная группа в молекуле флуоресцеина нереакционноспособна (см. рис. 5-6) и не может быть использована для получения конъюгатов флуоресцеина с антигенами. В настоящее время доступен ряд производных флуоресцеина, предназначенных специально для введения метки в состав других молекул. Наиболее широко используются флуоресцеинизотиоцианат, карбоксифлуоресцеин и аминофлуоресцеин, дихлоро-триазин-аминофлуоресцеин и многие другие коммерчески доступные соединения.

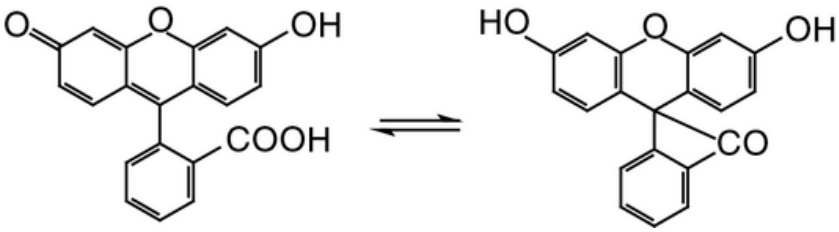


Рис. 5-6. Структурная формула флуоресцеина

Чистота трейсеров подтверждается методом протонного магнитного резонанса), МС и другими методами в зависимости от возможностей и доступности соответствующих приборов. Трейсеры в метанольных растворах обычно очень стабильны и не разлагаются годами при хранении, лучше сохраняются в защищенном от прямого солнечного света месте при низких температурах (в холодильнике).

Концентрацию трейсеров рассчитывают по оптической плотности раствора трейсера в 50 мМ карбонатном буфере (pH 9,0) при длине волны 492 нм, допуская, что коэффициент экстинкции для трейсеров такой же, как для флуоресцеина и равен 8,78·10^4^ М^ —1^ / см^ —1^. Рабочий раствор трейсера готовят в боратном буфере, интенсивность которого соответствует 20–100-кратному значению интенсивности флуоресценции фонового раствора (боратного буфера).

Измерение поляризации флуоресценции проводят на поляризационных флуориметрах.

Такие приборы обычно имеют термостат и специальные программы для измерений, расчета поляризации флуоресценции и других параметров. В качестве кювет для измерений используют специальные боросиликатные стеклянные пробирки или кварцевые кюветы, а также пластиковые планшеты черного цвета.

Поляризацию флуоресценции измеряют на приборах в ручном и автоматическом режимах. В зависимости от прибора время измерения аналитического сигнала одного образца составляет 5–7 с. При измерении на приборе TDx в полуавтоматическом режиме предусмотрены ручное дозирование иммунореагентов в пробирки и автоматическое измерение по программе Photo Check. Общее время измерения 10 образцов около 7 мин.

Определение аффинности антител методом ПФИА.

Для получения *кривых титрования антител* проводят серийное разведение растворов тестируемых антител, к которым добавляют фиксированное количество трейсера и измеряют поляризацию флуоресценции (рис. 5-7, *а*). В качестве контроля неспецифического связывания тестируют антисыворотку неиммунизированного животного. По результатам измерений строят график зависимости разведения антител (логарифмическая шкала) от величины поляризации флуоресценции (*mP*) и по этому графику определяют разведение антител, вызывающее 50% связывание трейсера (титр).

Для получения градуировочных графиков в измерительную пробирку вносят образец, раствор трейсера и раствор антител в оптимальном разведении (или концентрации). Проводят измерение поляризации флуоресценции в соответствии с программами приборов. На основании параллельных результатов измерения растворов

со стандартными концентрациями вещества строят градуировочный график зависимости величины поляризации флуоресценции *mP* от концентрации стандартных растворов вещества (логарифмическая шкала) (рис. 5-7, *б*).

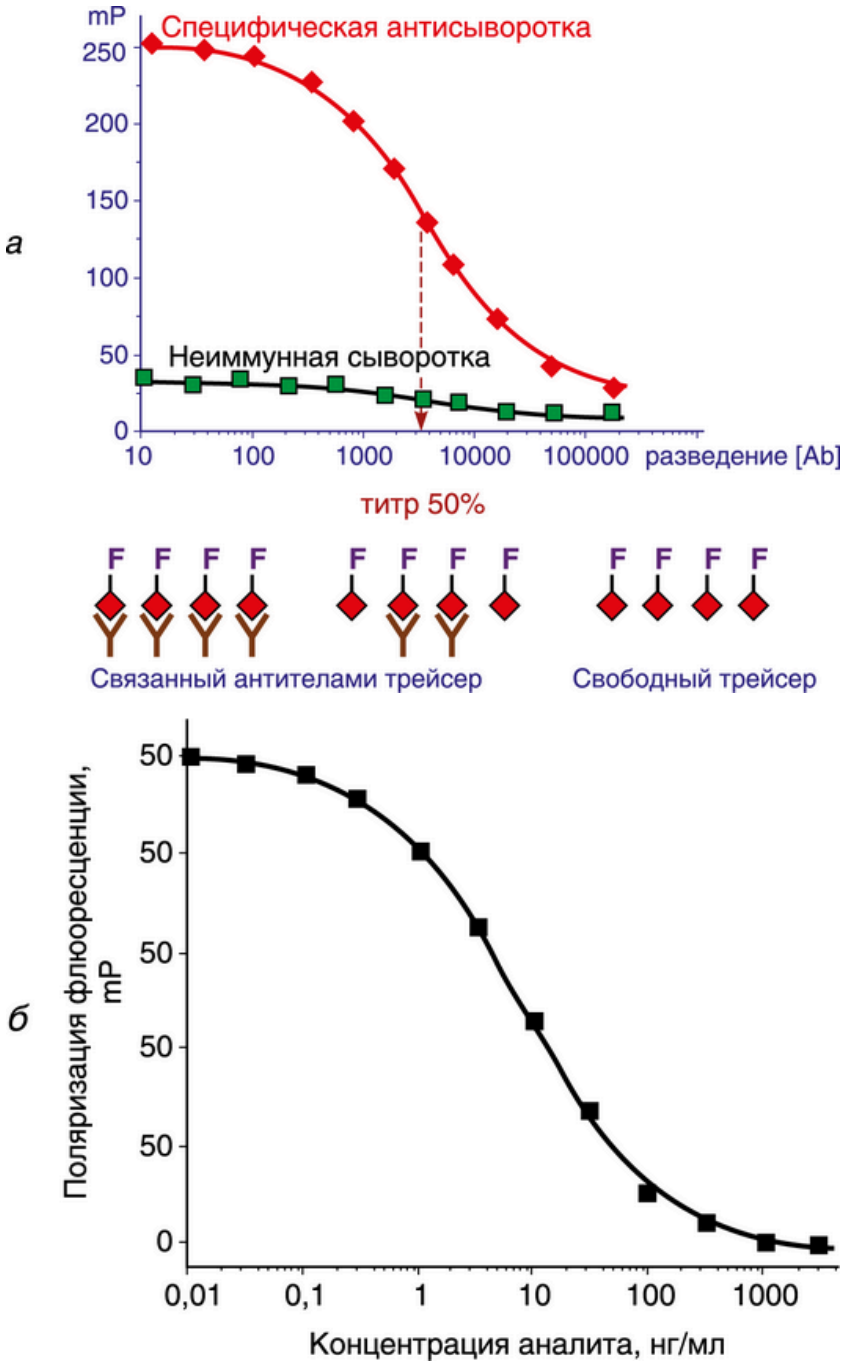


Рис. 5-7. График титрования антител методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (*а*) и градуировочный график определения вещества методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (*б*)

Расчет аналитических характеристик метода

При представлении градуировочных зависимостей поляризации флуоресценции от концентрации аналита используют десятичные логарифмы концентраций аналита: $mP = f(\lg C)$. Для сопоставления градуировочных графиков приводят нормированные графики в координатах $mP / mP_{\sim 0\sim}$ ($B / B_{\sim 0\sim}$) от логарифма концентрации аналита.

Типичная градуировочная кривая определения веществ методом ПФИА имеет сигмообразный вид (рис. 5-8), как и все градуировочные графики для ИХМ анализа низкомолекулярных веществ. Развитие программного обеспечения персональных компьютеров значительно упростило обработку нелинейных графиков. Наибольшее распространение для процедуры обработки экспериментальных данных и расчета градуировочного графика получили программы Origin и Sigma-Plot.

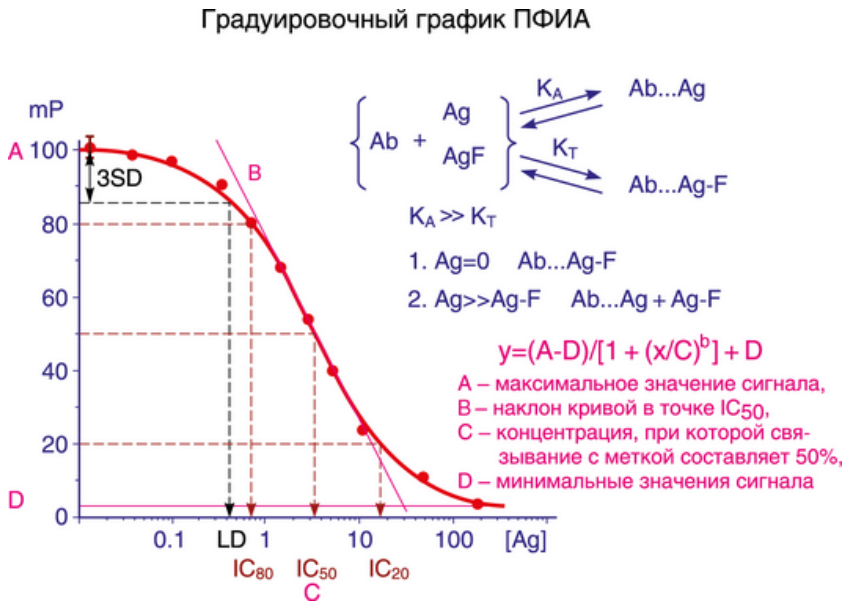


Рис. 5-8. Расчет основных аналитических параметров по градуировочному графику определения веществ методом ПФИА: *F* — флуоресцентная метка; *Ag* — антиген; *Ab* — антитело; *Ag-F* — трейсер (меченное флуоресцентной меткой производное определяемого вещества)

В качестве основных аналитических характеристик ПФИА были взяты чувствительность — тангенс угла наклона градуировочной кривой (коэффициент чувствительности), параметр *IC*~50~, предел обнаружения, диапазон определяемых концентраций, воспроизводимость определений (коэффициент вариации), правильность определений, специфичность, пороговая концентрация (для определения наркотиков).

Для ПФИА и других ИХМ под термином «чувствительность» понимают несколько параметров, два из которых рассчитываются из уравнения градуировочной кривой. Это коэффициент чувствительности (тангенс угла наклона градуировочного графика, параметр *b* на рис. 5-8) и параметр *c* (*IC*~50~ — концентрация аналита, при которой связывание с трейсером составляет 50%, т. е. середина градуировочной кривой). Обычно говорят, что разработан более чувствительный метод ПФИА, если удается уменьшить параметр *IC*~50 ~или предел обнаружения.

В некоторых случаях *пределом обнаружения* считают концентрацию исследуемого вещества, соответствующую 90% *B* / *B*~0~. Обычно используют предложенный Международным союзом теоретической и прикладной химии критерий 3*S*, учитывающий дисперсию колебаний холостого сигнала около среднего значения. Для определения предела обнаружения проводят несколько измерений нулевого стандарта (стандартного раствора, не содержащего аналита), рассчитывают стандартное отклонение и определяют предел обнаружения — концентрацию определяемого вещества, соответствующую минимальному значению аналитического сигнала:

$y_{min} = y_0 - 3S$,

где y_{min} — значение поляризации флюоресценции, соответствующее пределу обнаружения; y_0 — среднее значение поляризации флуоресценции для нулевого стандарта; *S* — стандартное отклонение.

В медицинских исследованиях часто определение предела обнаружения проводят не по методу 3*S*, а по подобному методу Родбарда. Этот параметр определяют как нижнюю измеряемую концентрацию вещества, которая с 95% вероятностью отличается от нулевого стандартного образца. По уравнению Родбарда,

$y_{min} = y_0 - t\,S$,

где y_{min} — минимальное достоверное значение поляризации флуоресценции, соответствующее пределу обнаружения; y_0 — среднее значение поляризации флуоресценции 20 повторов нулевого стандарта, *mP*; *t* — коэффициент Стьюдента при 95% доверительной вероятности (*t* = 2,086 при 20 измерениях); *S* — стандартное отклонение.

Диапазон определяемых концентраций должен соответствовать прямолинейному участку градуировочного графика. Обычно его определяют в диапазоне изменения сигнала от 80 до 20% ингибирования связывания

трейсера. Диапазон определяемых концентраций является важным параметром градуировочного графика, который дает первую информацию о чувствительности метода, так как в этом диапазоне наименьшие ошибки определения. Иногда рассчитывают предел количественного определения — значение концентрации, выше которой можно проводить количественное определение с установленной относительной правильностью или определенным доверительным интервалом в реальных образцах.

Нелинейная форма градуировочной кривой ПФИА способствует увеличению экспериментальной ошибки на границах диапазона определяемых концентраций. Поэтому большинство публикуемых сейчас работ по разработке ИХМ характеризуют параметром IC~50~, определяя его как основной показатель чувствительности анализа.

Воспроизводимость метода количественно определяют как относительное стандартное отклонение, которое в ИХМ принято обозначать как коэффициент вариации (КВ) результатов:

КВ = (стандартное отклонение / среднее значение концентрации аналита) × 100%.

Обычно проводят определение концентрации нескольких образцов и рассчитывают коэффициент вариации в одном анализе и между анализами, когда те же образцы тестируются в разное время, разными операторами и т.д. На величину коэффициента вариации влияют случайные ошибки анализа, качество измерительной аппаратуры и квалификация персонала. Обычно говорят о хорошей воспроизводимости результатов, когда коэффициент вариации менее 10% в одном анализе и менее 15% между анализами.

Правильность метода проверяется методом введено–найдено (тест на открытие), независимым методом (корреляция результатов с другими методами), анализом стандартного образца (тест на линейность).

Тест на открытие проводят по методу добавок определяемого вещества к образцам. На основании результатов определения концентрации веществ по градуировочному графику рассчитывают процент открытия, используя отношение найденной концентрации к рассчитанной. Аналогично проводят расчет процента открытия в тесте на линейность, в котором образцы, содержащие определяемое вещество, линейно разбавляют буфером и определяют концентрацию веществ в разбавленных образцах по градуировочному графику. Для корреляции результатов определения веществ методом ПФИА с результатами других методов (хроматографический, иммуноферментный и др.) проводят анализ большого числа образцов и рассчитывают коэффициент корреляции для графика зависимости концентраций, определенных по методу ПФИА и независимому методу. Обычно считается, что наблюдается хорошая корреляция результатов, если коэффициент корреляции более 0,9.

Точность метода — собирательный показатель воспроизводимости результатов и правильности определения. Результаты метода могут иметь хорошую воспроизводимость, но не быть правильными. И наоборот, правильные результаты могут быть получены методом с невысокой воспроизводимостью. Обычно методики ПФИА, как и других ИХМ, имеют хорошую воспроизводимость и правильность определений.

Специфичность метода характеризует взаимодействие антител с экзогенными и/ или эндогенными структурно-близкими аналогами определяемого вещества, содержащимися в реальных образцах (рис. 5-9).

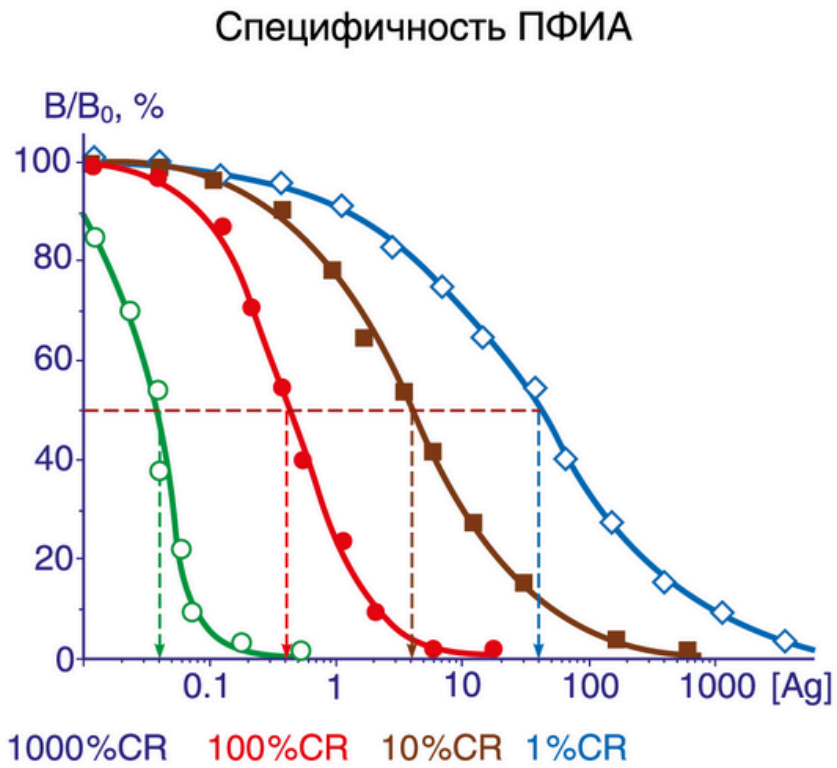


Рис. 5-9. График определения перекрестного реагирования методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа: *CR* (ПР) — перекрестное реагирование (кросс-реакция); *mP* / *mP*~0~ пропорционально *B* / *B*~0~ для нормированных графиков; *Ag* — антиген

Количественно специфичность выражают в *процентах перекрестного реагирования* (%ПР) и определяют при 50% ингибировании связывания трейсера (параметр *IC*~50~) по формуле

%ПР = (*C*~1~ : *C*~2~) × 100%,

где *C*~1~ — концентрация определяемого вещества; *C*~2~ — концентрация перекрестно реагирующего вещества.

Специфичность метода считается высокой, если ПР (*CR*) составляет менее 10% для перекрестно реагирующего вещества. Если ПР составляет 1%, то считается, что это вещество не влияет на определение анализируемого вещества. Некоторые вещества могут определяться с большей чувствительностью, чем определяемое вещество, поэтому ПР может быть и выше 100%. Так, например, для производных аналитов, на которые синтезируют иммуногены и получают антитела, процент перекрестного реагирования может составлять 1000. Это значит, что это вещество определяется с чувствительностью в 10 раз лучше, чем аналит.

Итак, принцип ПФИА заключается в конкуренции определяемого вещества и вещества, меченного флуоресцентной меткой, за связывание с ограниченным количеством антител. Метод основан на возрастании поляризации флуоресценции меченного флуоресцеином антигена при его специфическом связывании с антителами. Метод ПФИА очень прост в исполнении и заключается в добавлении к аликвоте образца (10–100 мкл) растворов меченного флуоресцеином гаптена и антител и последующем измерении поляризации флуоресценции. Общее время анализа не превышает нескольких минут.

5.2.4. Иммунохимические методы определения наркотиков и лекарственных препаратов

Мы подвергаемся действию психических
микробов и находимся в опасности
быть психически зараженными
[под психическими микробами
Бехтерев подразумевал внушение]… .
Фанатизм разжижает мозги.

Владимир Михайлович Бехтерев (1857–1927),
выдающийся русский и советский психиатр, невропатолог,
психолог, основоположник рефлексологии, академик, основатель
и директор Института по изучению мозга и психической деятельности

Для определения наркотиков и лекарств (см. гл. 6) в качестве предварительных методов используют РИА, ИФА, ПФИА, иммунохроматографический анализ (ИХА) с гарантированными пределами обнаружения в диапазоне от 0,1 до 500 нг / мл.

Радиоиммунный анализ

Методы РИА, очень чувствительные вследствие использования радиоактивных меток, дают возможность определять очень низкие концентрации аналита. Метод до сих пор имеет преимущества перед другими технологиями при определении токсикантов в крови и тканях благодаря независимости получаемых результатов от матричных эффектов. Большинство других ИХМ не могут быть применены при исследовании крови в случае летального исхода. Скрининг посмертной крови проводят после предварительной обработки ацетонитрилом или подобными растворителями для удаления белков. Желчь без предварительной обработки может быть протестирована на присутствие амфетаминов, барбитуратов, опиатов и фенциклидина (*PCP*), а после проведения пробоподготовки в желчи можно определять каннабиноиды и бензодиазепины. Сочетание высокой чувствительности и низкого матричного эффекта позволяет успешно обнаружить ЛСД в моче, рицин в тканях, каннабиноиды в волосах. Различные примеси, добавленные донорами, пытающимися скрыть факт употребления наркотиков, к образцу мочи, обычно не дают ложноотрицательного результата. Недостатками метода являются трудности, возникающие при уничтожении радиоактивных отходов, небольшие сроки годности тестов (обычно 60 дней) из-за радиоактивного распада. Этот гетерогенный тест трудно адаптировать к недорогим автоматическим анализаторам. Многие производители иммунологических РИА-тестов их больше не изготавливают для рутинных исследований из-за перечисленных недостатков, которые снижают потребительский спрос.

ИФА. Технология EMIT

Это ферментно-мультиплицируемый иммунный *гомогенный* тест, сущность которого и схема проведения исследования представлены на рис. 5-10. Меткой, присоединенной к наркотику в этом исследовании, является фермент глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (*G*-6-*P-DH*), который окисляет субстрат глюкозо-6-фосфат до глюкуронолактон-6-фосфата и также восстанавливает кофактор никотинамидадениндинуклеотид (*NAD*^+^) до *NADH*. Активность фермента подтверждается спектрофотометрическим измерением продукции *NADH* (при λ-340 нм). Ферментативная активность *G*-6-*P-DH* снижается, если прикрепленный наркотик связан с антителом, т. е. добавление наркотика вызывает высвобождение меченого наркотика из антитела, при этом возрастает степень продукции *NADH*. Изменение поглощения при λ-340 нм прямо связано с концентрацией наркотика в биосубстрате.

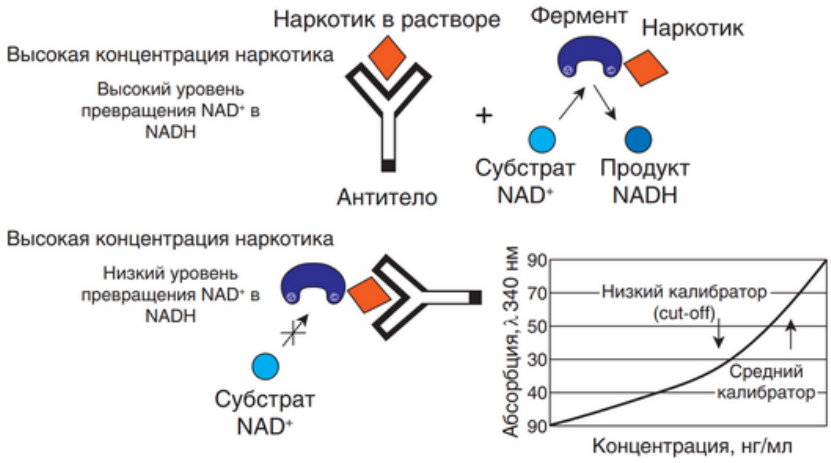


Рис. 5-10. Сущность технологии *EMIT* и схема проведения исследования (пояснения в тексте)

Преимущества:

* количество связанного меченого наркотика может быть измерено без отделения свободного; * этот гомогенный тест прост для автоматизации, поскольку реагенты можно смешивать, инкубировать и легко проводить измерение в реакционной емкости. Производительность анализатора до 500 образцов в час с помощью одной мониторинговой системы; * автоматизация снижает внутритестовую вариабельность и повышает достоверность результатов; * срок хранения наборов длительный (обычно более 1 года); * тесты различаются большим диапазоном концентраций; * используемые технологии широко внедрены в практику, методически близки, что облегчает подбор оборудования и снижает стоимость исследования; * изменение поглощения раствора измеряется как функция от времени. Поглощение излучающих веществ обычно не изменяется со временем, и его влияние минимизировано; * разработаны некоторые специфичные тесты, например на ЛСД.

Недостатки:

* влияние на результаты не только кросс-реактивных соединений, но и матричного эффекта, что ведет к нарушению ферментативных реакций. Например, салициловая кислота, метаболит аспирина в моче, может привести к ложноотрицательным результатам; * интерференция веществ обычно приводит к ложноотрицательным результатам; * определение ЛСД (см. выше) имеет линейные характеристики только при низких концентрациях (пг / мл), в другом случае дает большой процент ложноположительных результатов, возможно, из-за кросс-реактивности веществ.

ИФА. Технология CEDIA (clonal enzyme-donor immunoassay)

Это клонированный ферменто-донорный иммунный *гомогенный* тест, сущность которого и схема проведения исследования представлены на рис. 5-11.

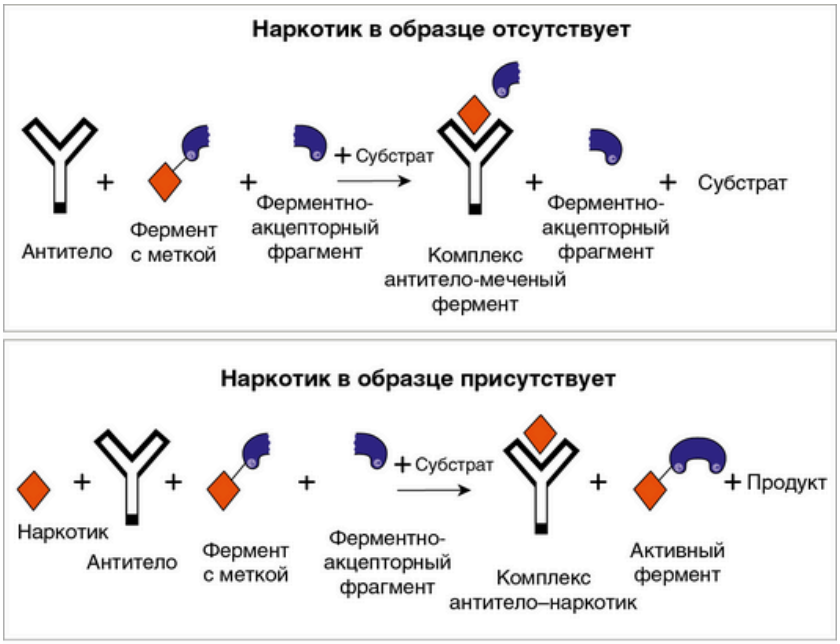


Рис. 5-11. Сущность технологии *CEDIA* и схема проведения исследования (пояснения в тексте)

CEDIA — запатентованная технология ИХМ, использующая в качестве ферментной метки фрагменты β-галактозидазы *E. coli,* полученные генно-инженерным способом. Активность фермента проявляется при сочетании двух фрагментов, называемых ферментно-акцепторным и ферментно-донорным. При ферментном гидролизе субстрат фермента — хлорфенилред-β-галактозид (*CPRG*) расщепляется на хлорфенилред (*CPR*) и галактозу. *CPRG* не поглощает значимую энергию при λ-570 нм. Для *CPR* максимальное поглощение наблюдается при λ-570 и 660 нм, что легко может быть измерено. Донорный фрагмент фермента связан с наркотиком и не будет гидролизовать субстрат, если находится в комплексе с антителом. Добавление наркотика вытесняет меченный ферментно-донорным фрагментом наркотик из конъюгата с антителом, что приводит к активации фермента (объединению донорного и акцепторного фрагментов), в результате происходит гидролиз субстрата и возрастает абсорбция (максимально при λ-570 и 660 нм). Концентрация наркотика в биологической жидкости прямо пропорциональна изменению поглощения.

Преимущества:

* гомогенный иммунотест; * срок хранения реагентов длительный (обычно более 1 года); * ферментативная активность часто полностью останавливается, когда связывание антитела блокирует реассоциацию фермента. Этот феномен делает высвобождение меченого наркотика, последующую реассоциацию фермента и получение окрашенного продукта прямо пропорциональными концентрации интересующего наркотика. Стандартный график линеен в широком диапазоне значений концентраций; * мониторинг второй длины волны, 660 нм, обеспечивает некоторую меру защиты от влияния мешающих веществ, которые могут поглощать УФ-свет при первой длине волны, равной 570 нм. Изменение поглощения раствора измеряется как функция от времени. Поглощение мешающих веществ обычно не изменяется со временем, и их вклад минимизирован; * CEDIA имеет трехкомпонентный набор для исследования, который может быть использован для измерения ЛСД. Метод имеет большой линейный диапазон, что снижает вероятность фальсификации.

Недостатки:

* разработанных методик недостаточно, так как технология относительно новая, но работы в этом направлении продолжаются; * достаточно велик процент ложноотрицательных результатов из-за влияния примесей в моче и матричного эффекта.

ИФА. Технология ELISA

Это технология (см. п. 5.2.1) определения наркотика с помощью иммуносорбентов, связанных с ферментами (*гетерогенный* или *твердофазный тест)*, сущность которого и схема проведения исследования представлены на рис. 5-12.

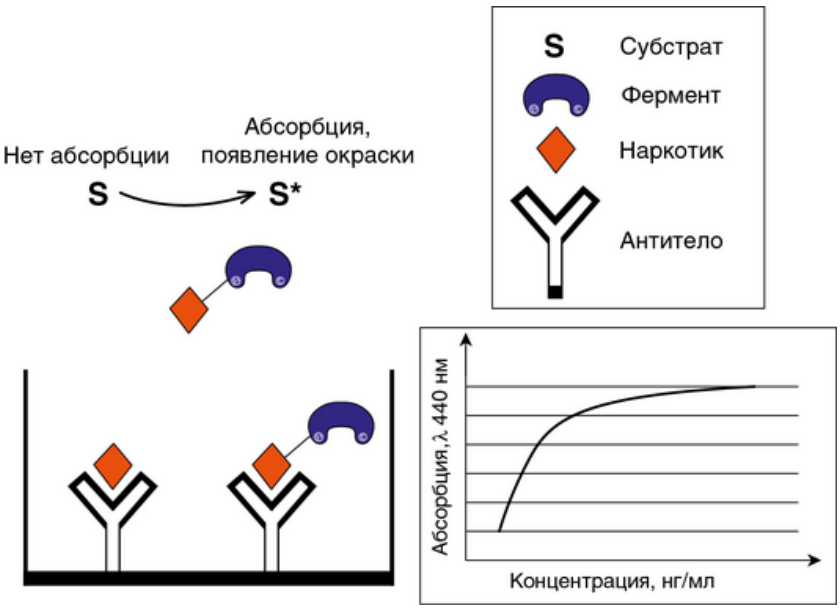


Рис. 5-12. Сущность технологии *ELISA* и схема проведения исследования (пояснения в тексте)

Если в растворе нет наркотика, то меченый фермент (пероксидаза хрена) превращает субстрат тетраметилбензидин (*TMB*) в окрашенный продукт (λ~max ~— 450 нм). Если часть наркотика в комплексе фермент–наркотик связывается с антителом, прикрепленным к поверхности микротитрованной пластинки, то активность фермента снижается. Меченый наркотик высвобождается из связывающего центра антитела, и активность фермента восстанавливается пропорционально концентрации наркотика в добавленном образце.

Преимущества:

* высокочувствительная технология; * менее выражены матричные эффекты (гетерогенный тест); * технология двойной промывки позволяет анализировать образцы посмертной крови; * автоматизация возможна и проще, чем в РИА; * срок годности ферментной метки больше, чем радиоактивной метки в РИА.

Недостатки:

* адаптация к обычным высокоскоростным анализаторам затруднена, так как это гетерогенный метод. Используются специальные анализаторы (только для этой технологии); * стоимость анализа одного образца выше, чем при использовании гомогенного метода из-за необходимости использовать специальный анализатор; * консервант мочи — натрия азид (бензоат), добавляемый для сохранности образцов, блокирует активность пероксидазы хрена, в этом случае метод не может быть использован для анализа подобных образцов.

Методы с использованием частиц в качестве меток. Технология KIMS

Это технология определения наркотика, использующая *кинетическое взаимодействие микрочастиц в растворе* (гомогенный тест*)*, сущность которого приведена ниже.

Меченые соединения, используемые в данной технологии, — это микрочастицы, связанные с молекулами наркотиков. В отсутствие определяемого наркотика конъюгат микрочастицы и молекулы наркотика связывает несколько молекул антител. При этом образуются большие агрегаты, которые рассеивают направленный свет. Пока продолжается реакция агрегации, возрастает абсорбция. Добавленный наркотик конкурирует за связь с микрочастицами и таким образом ингибирует образование агрегатов, что уменьшает уровень поглощения света пропорционально концентрации наркотика.

Преимущества:

* дешевый гомогенный тест; * срок годности наборов длительный (обычно более 1 года); * конъюгаты микрочастица–наркотик более стабильны, чем конъюгаты фермент–наркотик; * вещества, которые мешают процессу агглютинации в KIMS, обычно ведут к ложноположительным результатам. Это является преимуществом, потому что иммунотесты — скрининговые тесты для идентификации образцов, которые могут содержать наркотики. Образцы, содержащие и наркотики и мешающие субстанции, будут распознаны как положительные на KIMS и потребуют подтверждающих тестов, тогда как другие технологии, такие как EMIT, дадут ложноотрицательные результаты и не будут идентифицироваться подтверждающими тестами; * изменение поглощения раствора измеряется как функция от времени. Поглощение мешающих веществ обычно не изменяется во времени, их вклад минимизирован.

Недостатки:

* микрочастицы раствора, используемого в KIMS-тестах, покрывают аналитические трубки, которые в результате требуют специального обслуживания.

Поляризационный флуороиммуноанализ

Сущность метода и схема проведения исследования в общем виде описаны выше и представлены на рис. 5-13.

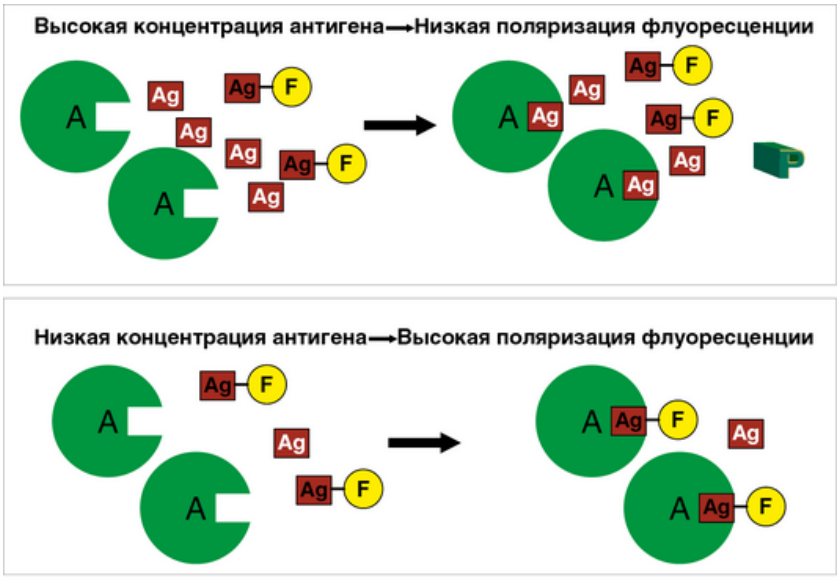


Рис. 5-13. Принцип поляризационного флуоресцентного иммуноанализа: *F* — флуоресцентная метка; *Ag* — антиген; *Ab*— антитело; *Ag-F* — трейсер [меченное флуоресцентной меткой производное определяемого вещества (пояснения см. п. 5.2.3)]

Преимущества:

* гомогенный тест; * наркотик, меченный флуоресцеином, более стабилен, чем конъюгат наркотик–фермент; * флуоресценция пробы обеспечивает низкий предел обнаружения; * матричный эффект меньше влияет на изменение поляризации флуоресценции, чем на изменение прямой интенсивности света, что делает технологии ПФИА при определении наркотиков в крови или образцах мочи, хранившихся в течение нескольких дней, более точными, чем технологии ИФА; * срок хранения реагентов длительный (обычно более 1 года).

Недостатки:

* тесты более дорогие, чем тесты ИФА; * флуоресценция солей в желчи иногда дает ложноположительные результаты; * в настоящее время немногие технологии ПФИА адаптированы к обычным высокоскоростным анализаторам.

Иммунохроматография на тест-полосках

Этот метод основан на протекании иммунной реакции антиген–антитело при движении тестируемого образца жидкости по полоске за счет капиллярных сил и визуальной детекции образования окрашенных зон в различных участках полосок с иммобилизованными иммунореагентами.

Поскольку антитела специфичны к соединению определенной структуры, то наборы выпускают на отдельную группу наркотических средств (опиаты, кокаин, каннабиноиды, барбитураты и т.д.), что требует последовательного анализа исследуемого биообъекта на каждую из групп. В настоящее время разработаны тест-системы и для одновременного выявления в моче от двух до шести групп наркотиков.

По исполнению тест-системы и диагностикумы (наборы реагентов) предусматривают гомогенный или гетерогенный варианты анализа. При определении низкомолекулярных веществ, таких как наркотики, используется конкурентный формат иммунохроматографии. Для иммунохроматографических тест-полосок в качестве меток используют ферменты или окрашенные мелкодисперсные вещества, например коллоидное золото. Частицы коллоидного золота диаметром от 5 до 50 нм имеют ярко-красную окраску, которая легко детектируется. На эти частицы иммобилизуют антитела, чаще всего аффинно очищенные поликлональные или моноклональные. Для детекции ферментной метки дополнительно добавляют раствор субстрата, а определение метки коллоидного золота происходит визуально без дополнительной обработки. В настоящее время практически для всех иммунохроматографических тест-полосок используются окрашенные мелкодисперсные метки и образование иммунного комплекса детектируется непосредственно в ходе движения жидкости.

В отличие от других ИХМ проведение ИХА на тест-полосках не требует никаких дополнительных реагентов: все необходимые иммунореагенты находятся на тест-полоске.

Принцип ИХА состоит в следующем (рис. 5-14). На верхнем участке тест-полоски мембранного носителя иммобилизован конъюгат антигена с белком-носителем (*тест-зона*), а в другом месте (обычно выше по полоске на 0,5–1 см) иммобилизованы антивидовые антитела (*контрольная зона*), которые используют для контроля пригодности иммунореагентов. На нижний участок тест-полоски, который будет погружен в детектируемую жидкость, сорбируют меченные (обычно коллоидным золотом) антитела на определяемый антиген.

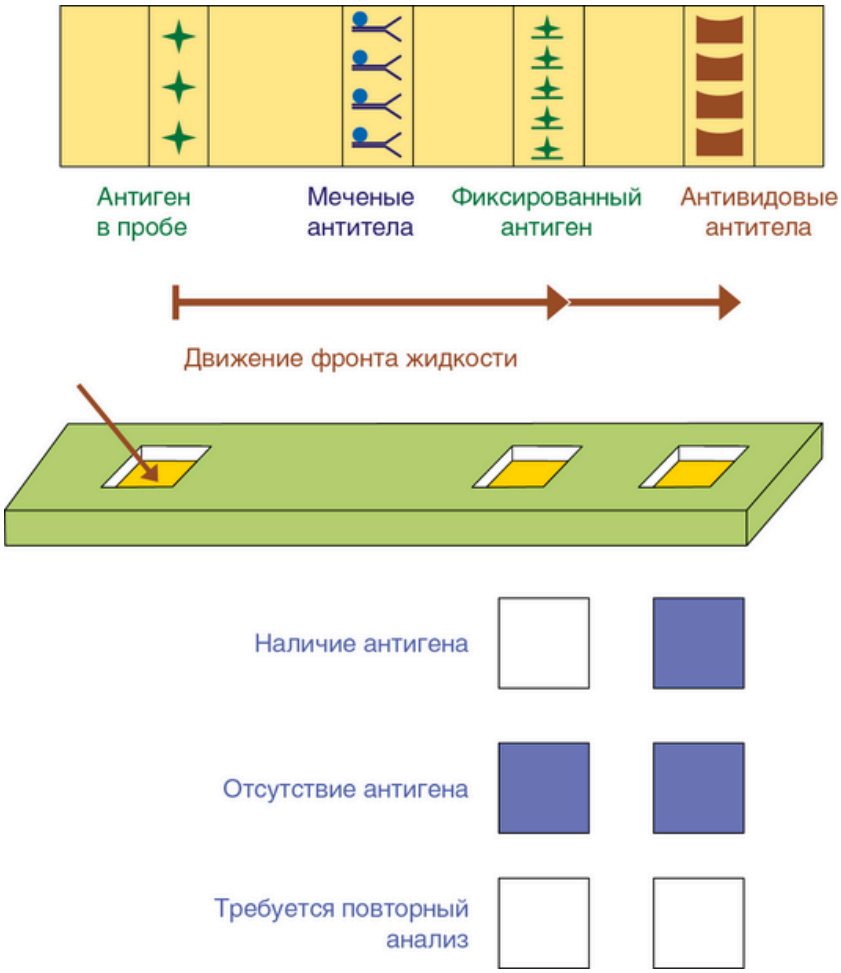


Рис. 5-14. Принцип и результаты иммунохроматографического анализа на тест-полосках

При погружении тест-полоски в пробу образца жидкость начинает подниматься под действием капиллярных сил по мембране и проходит нижний участок полоски с сорбированными мечеными антителами, которые также начинают подниматься с потоком жидкости.

Если в тестируемой пробе *антиген есть* (в концентрации не ниже установленного порогового уровня), то он будет взаимодействовать с мечеными антителами с образованием иммунного комплекса. Это приведет к блокировке активных центров связывания меченых антител, и такой иммунный комплекс не будет связываться с иммобилизованным антигеном в тест-зоне, а будет продвигаться выше. В результате *тест-зона будет не окрашена.* Далее иммунный комплекс антигена с антителом, меченным коллоидным золотом, будет продвигаться до участка полоски с иммобилизованными антивидовыми антителами. На этом участке будет формироваться антивидовой иммунный комплекс, что приведет к окрашиванию контрольной зоны. При проведении пробы *контрольная зона окрашивается всегда* (в пригодных к использованию полосках). Результат считают *положительным* (наличие наркотика в пробе), если на тест-полоске есть *одна окрашенная* (контрольная) зона.

Появление окраски в контрольной зоне служит контролем пригодности тест-полоски для использования. Если окраски в контрольной зоне нет, то иммунореагенты на тест-полоске неактивны, и результаты определения нельзя оценить. Необходимо повторить тестирование с помощью новой тест-полоски.

Если в пробе определяемого *антигена нет*, то окрашенные меченые антитела доходят до верхнего участка полоски с иммобилизованным антигеном — тест-зоны. Происходит иммунная реакция, и *тест-зона окрашивается.* Результат считают *отрицательным* (отсутствие наркотика в пробе), если на тест-полоске есть *две окрашенные* зоны (тест-зона и контрольная).

* Формирование на тест-полоске одной окрашенной (контрольной) зоны свидетельствует о положительном результате анализа (выявление антигена в концентрации не ниже контролируемой). * Формирование двух окрашенных зон означает отсутствие антигена в исследуемой пробе. * Отсутствие окрашенных зон означает, что тест-полоски не могут быть использованы для проведения ИХА.

Положительный результат исследования, полученный на тест-полосках, далеко не всегда свидетельствует об употреблении наркотических и психотропных веществ и обязательно должен подтверждаться другими специфическими методами. Ввиду высокой чувствительности ИХМ следует осторожно подходить к оценке и интерпретации полученных результатов при анализе образцов с крайне малым содержанием наркотических веществ. Например, прием терапевтических доз лекарственных препаратов (барбитуратов, бензодиазепинов) может дать положительный результат анализа с помощью тест-системы, но это не свидетельствует о немедицинском использовании указанных веществ. Тест-полоска на каннабиноиды может дать ложноположительный результат, если в образце мочи в относительно большом количестве содержится папаверин с дибазолом, например лекарственный препарат папазол. Поэтому положительный результат *без дополнительного исследования другими методами* имеет предварительное значение.

Оборудование, вспомогательные материалы и посуда

* Герметично закрытый влагонепроницаемый пакет, содержащий тест-полоску. * Пластиковый или стеклянный контейнер для мочи на 100–200 мл.

Сбор и подготовка образцов мочи. Свежие пробы мочи собирают в чистые сухие пластиковые или стеклянные контейнеры, не использованные ранее для сбора мочи и не содержащие консервантов. Пробы можно исследовать немедленно или хранить в холодильнике (2–8 °С) до 48 ч. Для более длительного хранения пробы мочи замораживают при –20 °С или более низкой температуре.

Процедура определения. Все компоненты теста и образца мочи перед проведением анализа нагревают до комнатной температуры. Вскрывают упаковку тест-полоски, разрывая ее вдоль прорези и стараясь не касаться рабочей поверхности мембраны. Извлекают полоску и погружают ее вертикально в мочу до уровня ограничительной линии на 30–60 с. Тест-полоску из мочи вынимают и кладут на горизонтальную поверхность, через 5 мин учитывают результат реакции. В зависимости от типа мембраны, используемой для изготовления тест-полосок, процедура занимает 5–10 мин.

Преимущества:

* простота метода (нет необходимости в дополнительных реагентах и приборах, нет стадий пипетирования и промывки — все необходимые иммунореагенты для анализа нанесены заранее на мембрану); * определение может быть проведено неподготовленным персоналом в нелабораторных условиях; * экспрессность метода — получение результата в течение нескольких минут; * визуальная детекция результатов для качественного или полуколичественного определения.

На предварительном этапе быстрая и простая диагностика, не требующая дополнительного оборудования, реактивов и специальных навыков, может быть полезна в качестве вспомогательного скринингового метода.

Минздравом России разрешены к применению иммунохроматографические экспресс-тесты (тест-полоски) российского и зарубежного производства для выявления содержания ряда наркотических средств и психотропных веществ и/ или их метаболитов в моче человека: амфетамина, метамфетамина, каннабиноидов (при употреблении марихуаны или ее продуктов), морфина (опиатов), кокаина, бензодиазепинов, барбитуратов, метадона, фенциклидина, экстази, трициклических антидепрессантов.

В последнее время был разработан новый способ выявления скрытых форм наркомании — определение в сыворотке крови антител к наркотическим веществам методом ИФА. Антитела к наркотическим веществам определяются, даже если испытуемый воздерживался от употребления наркотиков более 1 нед, поскольку антитела к наркотическим веществам циркулируют в крови после последнего употребления в течение 2–3 мес. Разработаны наборы для определения антител в крови к опиатам, каннабиноидам и амфетаминам.

Особенности и трудности определения наркотиков

Моча — это аналитически верный выбор образца для скрининговых иммунотестов, так как обычно в ней меньше мешающих определению протеинов и продуктов распада эндогенных веществ, но образцами могут быть также другие жидкости или ткани. Так, в случаях, когда быстрое наступление смерти (например, наличие иглы в вене

умершего) связано с передозировкой наркотика (например, героина), будут наблюдаться высокие концентрации морфина в крови, но не в моче (скрининговые иммунотесты мочи на опиаты будут отрицательными).

Получение результатов скрининговых исследований крови и их интерпретация — более сложная задача, так как сильнее проявляются матричный эффект, кросс-реактивность и влияние сопутствующих веществ. Белки обычно осаждают до анализа ацетонитрилом или подобным растворителем, отбирая пипеткой верхнюю фракцию для исследования ИХМ.

Следует иметь в виду особенности проведения исследования ИХМ.

* Со временем кровь умершего разлагается, продуцируя биогенные амины, которые перекрестно реагируют с антителами в иммунологических исследованиях на амфетамины и дают ложноположительные результаты. Например, в биологических жидкостях может накапливаться тирамин, перекрестно реагирующий в иммунологических исследованиях. * Соли желчи, часть из которых флуоресцируют, могут давать ложноположительные результаты при проведении ПФИА. * Некоторые тесты РИА и ELISA будут давать ложноположительные результаты на каннабиноиды в хранившихся некоторое время образцах крови. Механизм этого явления пока неясен. * Высокие концентрации дифенгидрамина (димедрола) дают ложноположительные результаты в некоторых иммунотестах мочи на фенциклидин (PCP). * Дигидрокодеин и кодеин дают ложноположительные результаты в большинстве исследований на морфин. * Тесты ИФА могут давать ложноотрицательные результаты, если в образце присутствует консервант (NaF или NaN~3~). * Высокая концентрация наркотика в крови подтверждает недавнее употребление наркотика, что может быть важно для расследования обстоятельств дела.

Перекрестная реактивность, или *кросс-реакция* (связывание структурно родственных веществ). Это особая, весьма важная и специфическая проблема определения наркотиков ИХМ. Перекрестная реактивность для определяемых веществ обязательно должна быть известна (по возможности). Большинство производителей приборов и тест-полосок для ИХМ исследуют потенциальные мешающие вещества, и их перечень вкладывается в упаковку оборудования. Результаты исследований дают возможность публиковать более полные списки веществ, имеющих перекрестную реактивность (табл. 5-3). Однако метаболиты этих веществ обычно труднодоступны для определения, часто их концентрация в моче весьма высокая, что влияет на результаты иммунологических исследований. Например, фенфлурамин (вещество, используемое для лечения ожирения) имеет низкую перекрестную реактивность при определении амфетаминов, но его метаболит в моче — норфенфлурамин — имеет более высокую перекрестную реактивность и дает ложноположительные результаты.

Таблица 5-3. Кросс-реактивность в иммунохимическом анализе

Иммунотесты	**Вещества, дающие кросс-реакцию**
Амфетамин / метамфетамин	МДА, МДМА, хлорохин, эфедрин, псевдоэфедрин, фенилпропаноламин, тирамин, фентермин, фенметразин, фенфлурамин, ранитидин
Бензодиазепины	Хлорпромазин
Бензоилэкгонин (кокаин)	Экгонин, метиловый эфир экгонина, кокаин
Каннабиноиды (ТГК-метаболиты)	Кетопрофен, толметин, напроксен, ибупрофен, ацетилсалициловая кислота
ЛСД	Эрготамин, трициклические антидепрессанты, верапамил, серталин, фентанил
Морфин	Кодеин, дигидрокодеин, тебаин, гидрокодон, оксикодон, оксиморфон, меперидин, норкодеин
Фенциклидин (PCP)	Декстрометорфан, теноциклидин (*TCP*)

Примечание. МДА — метилендиоксиамфетамин; МДМА — метилендиоксиметамфетамин; ЛСД — диэтиламид лизергиновой кислоты; ТГК — тетрагидроканнабинол (см. гл. 6).

Во многих наборах иммунотестов помимо антисыворотки и меченого антигена имеются калибраторы и контрольные растворы. *Калибратор* — это раствор, содержащий анализируемое вещество в известных концентрациях

и используемый для установления измеренной концентрации в аналите. Калибраторы используют в соответствии с аналитическими требованиями. *Контрольные растворы* готовят в свободной от наркотиков биожидкости. Если иммуноанализ применяется как скрининговый тест, то достаточно одного калибратора. Для количественных тестов в каждом исследовании должно быть использовано несколько калибраторов с различными в низких и высоких областях концентрациями аналита в линейном диапазоне. Лаборатория должна обосновать и подтвердить ограничение детекции и линейный диапазон для используемой методики. Результат теста варьирует в зависимости от партии используемых иммунореагентов, поэтому периодически необходимо подтверждать параметры эффективности технологии.

Иммунотесты постоянно совершенствуются и приобретают бóльшую специфичность к таким наркотикам, как амфетамины, бензоилэкгонин, каннабиноиды, морфин, кодеин и *PCP*. Тем не менее остаются нерешенные вопросы. Примеры. Иммунотесты на каннабиноиды, определяющие метаболит 11-нор-9-карбокси- Δ^9^-ТГК глюкуронид, идентифицируют большее число лиц, употребляющих наркотик, чем иммунотесты, определяющие другой метаболит — неконъюгированную кислоту (см. гл. 6). Идентификацию бензодиазепинов проводят (по разным методикам) как по неконъюгированному наркотику, так и по конъюгированному метаболиту, хотя конъюгированная форма находится в моче в большей концентрации (см. гл. 6). Решение вопроса было найдено: перед тестированием предложено добавлять в образец мочи β-глюкуронидазу (для гидролиза конъюгатов).

Ряд производителей изготавливают спектр доступных антител, позволяющих потребителям выбирать подходящий набор для применения.

Пороговая концентрация (cut-off). Cut-off — термин, используемый в скрининговых методах исследования, так как они распознают образцы либо как положительные, либо как отрицательные без сообщения количественных результатов. *Пороговая концентрация (cut-off)* — это концентрация вещества, выше которой образец заведомо содержит определяемое вещество или, как говорят, является положительным образцом. Cut-off — это концентрация наркотика, ниже которой образцы рассматриваются как отрицательные.

Пороговая концентрация не рассчитывается, а принимается такой, при которой не может быть ложноположительного результата, т. е. ошибки в качественном определении. Чем чувствительнее метод, тем пороговая концентрация ниже. Например, для ПФИА пороговая концентрация наркотика метамфетамина принята равной 1 мкг / мл, тогда как для ТСХ она в несколько раз больше.

Пороговую концентрацию при скрининговом анализе определяют как концентрацию, по крайней мере в 3 раза бóльшую, чем предел обнаружения метода. Для этого обычно проводят определение фонового значения наркотика путем измерения не менее 30 образцов нормальной мочи от здоровых людей. Пороговая концентрация устанавливается индивидуально для каждого наркотика с учетом проведенных испытаний. Некоторое огрубление пороговой концентрации практически сводит к минимуму вероятность получения ложноположительных результатов при скрининге образцов мочи.

Пороговые концентрации, или *уровни,* определения наркотических и психотропных веществ приведены в табл. 5-4.

Таблица 5-4. Пороговые уровни определения (cut-off) наркотических и психотропных веществ с помощью иммунохимического метода, нг/мл

Вещества	**ИХА (тест-полоски)**	**ПФИА**	**ИФА**
Морфин (опиаты, в том числе кодеин и героин)	300	200	10
Каннабиноиды	50	25	5
Амфетамин	1000	—	—
Метамфетамин	1000 (500)	—	—
Амфетамин / метамфетамин	—	300	10
Экстази	500	—	—
Метадон	300	250	—
Кокаин и его основной метаболит (см. гл. 6)	300	300	10

Барбитураты	300	200	10
Бензодиазепины	300	200	10
Фенциклидин	25	25	5
ЛСД	—	0,5	

Примечание. Приведены данные по источникам литературы стран ЕС и США. Прочерк — не определяли.

В различных странах мира понятие административного cut-off представляет особую проблему для тестирования на наркотики. Cut-off устанавливают таким образом, что каждый человек вне зависимости от того, в какой лаборатории тестируется образец, должен получить одинаковые результаты, соответствующие содержанию искомых аналитов. Это означает, что порог обнаружения наркотических и сильнодействующих веществ должен быть легкодостижим и одинаков для любой лаборатории. За рубежом cut-off различных наркотиков в моче установлена, но величина cut-off отличается между собой в разных странах (см. гл. 4).

Определение антибиотиков и сульфаниламидов

Некоторые антибиотики (например, стрептомицин, хлорамфеникол) находят широкое применение в ветеринарной практике и животноводстве в качестве лечебных и профилактических средств, что приводит к загрязнению продуктов питания животного происхождения остаточными количествами антибиотиков**.** Для тщательного контроля пищевых продуктов на наличие в них остатков антибиотиков, например аминогликозидных, используют хроматографические методы с разными видами детекции — масс-спектрометрической, электрохимической, флуоресцентной, УФ. Эти методы характеризуются высокой чувствительностью и точностью (см. п. 5.3), но они трудоемкие и требуют длительной пробоподготовки. Предельно допустимая концентрация (ПДК) антибиотиков, например в молоке, — 500 нг / мл. ПФИА позволяет эффективно вести мониторинг за содержанием антибиотиков в продуктах питания (табл. 5-5).

Таблица 5-5. Предел обнаружения антибиотиков методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа, нг/мл

Антибиотик	**Предел обнаружения**	**Линейный диапазон концентраций**
Гентамицин	110	150–4500
Канамицин	80	100–5000
Стрептомицин	15	20–10000

ПФИА стрептомицина используют для экспертизы образцов молока. Хотя в этом случае наблюдается значительное влияние матрицы и образцы необходимо разбавлять дистиллированной водой, это не снижает экспрессность анализа и в то же время позволяет определять достаточно низкие концентрации антибиотика. На примере определения гентамицина было показано, что, используя те же самые иммунореагенты, как и для ПФИА, возможно проводить флуоресцентный иммуноанализ по тушению флуоресценции для определения антибиотика, используя обычный флуориметр, который может быть простым и миниатюрным.

Метод ПФИА позволяет специфически определять один сульфаниламид из большого числа соединений со сходной структурой NH~2~—C~6~H~4~—SO~2~—NH—R. Ведутся исследования, и получены предварительные результаты по созданию мульти-ПФИА, т. е. одновременного определения нескольких соединений, близких по структуре. В настоящее время метод ПФИА оптимален для тестирования антител, определения аффинности и стратегии по выбору иммунореагентов для определения многих лекарств.

ИХМ также используют при определении пестицидов, экополлютантов, гормонов, токсинов, металлов и металлсодержащих веществ, а также в допинг-контроле (см. гл. 7–10).

5.3. Хроматографические методы определения токсикантов

Мудрость, подобно черепаховому супу,
не всякому доступна.

Козьма Петрович Прутков — коллективный псевдоним четырех авторов (Алексея Константиновича Толстого, братьев Алексея, Владимира и Александра Жемчужниковых), под которым они печатались в 50–60 годы XIX века в ряде журналов

5.3.1. Классификация, термины и определения

Хроматография — физико-химический метод разделения веществ или частиц, основанный на различии в скорости их перемещения в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз. В более широком смысле хроматографией называют науку о межмолекулярных взаимодействиях и переносе молекул или частиц в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз. Эти два определения даны Научным советом по хроматографии и адсорбции РАН.

Классификации хроматографических методов, основанные на рекомендациях Международного союза теоретической и прикладной химии и предложенные Научным советом по хроматографии и адсорбции РАН, комментарии о сущности хроматографических методов, понятия, термины и определения, используемые в хроматографии, изложены в ранее изученных курсах фундаментальных физико-химических дисциплин.

5.3.2. Хроматография в тонком слое сорбента

Один опыт я ставлю выше, чем тысячу
мнений, рожденных только воображением.

Михаил Васильевич Ломоносов (1711–1765), первый крупный русский ученый-естествоиспытатель, энциклопедист, физик, химик, астроном, поэт, основатель Московского университета

ТСХ — один из основных методов определения токсикантов. Методические приемы, разработанные в 70–80-е годы прошлого столетия, значительно увеличили эффективность ТСХ:

* существует возможность разделения (за один цикл) до 40 компонентов анализируемых смесей; * время разделения составляет 15–20 мин; * существует возможность анализировать нанограммовые количества (10^–9^ г) проб; * предельно определяемые количества отдельных компонентов достигают 10^–15^ г.

Один из вариантов ТСХ получил название *ВЭТСХ — высокоэффективной тонкослойной хроматографии* (см. ниже).

Во многих случаях у оперативных и следственных подразделений возникает необходимость определения природы вещества и отнесения его к наркотическим средствам до возбуждения уголовного дела. Поэтому применяемые методы должны в короткие сроки надежно идентифицировать представленное на исследование вещество и квалифицировать совершенное преступление. Одним из таких методов является ТСХ.

Методическая и приборная база этого метода позволяют автоматизировать и стандартизировать условия проведения исследований для получения воспроизводимых результатов. Использование селективных реактивов для определения, например, наркотических, психотропных и сильнодействующих веществ резко повышает надежность их идентификации. Хроматографические зоны исследуемых веществ легко извлекаются с пластин, что позволяет дополнять уже имеющуюся информацию об этих веществах результатами исследования другими методами, например спектральными.

На практике получили широкое распространение инструментальные методы определения разделенных зон непосредственно на хроматографических пластинах. Получение спектров отражения исследуемого токсиканта в видимой, УФ-, ИК-областях света, наряду с данными поведения вещества в различных хроматографических системах, в ряде случаев имеет положительное судебно-химическое значение.

Основы ТСХ и ее применение для исследований различных групп токсикантов обсуждены во многих монографиях и обзорах (см. рекомендуемую литературу).

ТСХ при проведении ХТА используют для решения двух задач:

* подтверждения (или отрицания) присутствия конкретного вещества в исследуемом образце (направленный скрининг, см. гл. 4); * скрининговых исследований образца неизвестной природы (ненаправленный скрининг, см. гл. 4).

Методика проведения эксперимента. В ТСХ обычно используют закрепленные слои на металлической, стеклянной или пластиковой подложке. Для закрепления слоя применяют гипс, крахмал или другие связующие компоненты, а в качестве адсорбентов — силикагели различного зернения, обработанные или не обработанные реактивами для осуществления как прямого, так и обращенно-фазового вариантов хроматографии, а также целлюлозу, оксид алюминия, полиамиды и некоторые другие материалы. Часто к адсорбентам добавляют флуоресцентный индикатор. В криминалистической практике обычно используют пластины размером 5×5, 10×10 или 20×20 см. Хроматографирование веществ проводят в герметически закрытых камерах. При этом наиболее часто из всех возможных вариантов используется восходящее и горизонтальное элюирование хроматографической системы растворителей. В ряде случаев хорошие результаты дает многомерная и круговая хроматография.

Перед началом разделения пластину размечают соответствующим образом: отмечают линии старта и фронта растворителя, зоны хроматографирования исследуемых веществ и стандартов-метчиков. Особо отмечают условия эксперимента и дату его проведения, а также другую необходимую информацию. Все отметки на пластине не должны нарушать равномерность слоя адсорбента.

Анализируемые растворы осторожно, чтобы не повредить поверхность слоя адсорбента, наносят на пластину в несколько приемов, используя мерные капилляры или микрошприцы, обращая внимание на размеры получаемого пятна. Одновременно на пластину наносят эталонные растворы исследуемых веществ или растворы метчиков в соответствии с утвержденными методиками.

Системы растворителей смешивают в требуемых соотношениях непосредственно перед использованием при помощи интенсивного перемешивания. Иногда при смешивании растворителей возможно образование мутного раствора. В таких случаях полученную смесь заливают в хроматографическую камеру, стенки и дно которой проложены фильтровальной бумагой. Если в конкретной методике нет специального разъяснения, то камеры герметически закрывают крышкой и оставляют на 0,5–1 ч для насыщения парами растворителя (установления равновесия). Для каждой новой пластины готовят новую порцию системы. Допускается временное хранение готовой системы в посуде с притертой пробкой.

Количество растворителя для проведения эксперимента рассчитывают таким образом, чтобы при восходящем варианте проведения хроматографии уровень его соответствовал погружению пластины не более чем на 5 мм. Расход системы на стандартную камеру для пластин размером 10×10 см с плоским дном составляет 4–4,2 мл.

Хорошей практикой считается использование отдельной хроматографической камеры для каждой конкретной разделительной системы. При необходимости быстрой смены используемой системы растворителей камеру просушивают, промывают 10 мл этанола, сушат и затем промывают растворителем, использование которого планируется.

После помещения пластинки в хроматографическую камеру растворитель движется по пластине под действием капиллярных сил, пока не достигнет линии финиша, после чего пластинку вынимают и сушат.

Качественный анализ

Наиболее часто проявление хроматографических зон осуществляется по свечению в УФ-свете или гашению флуоресценции индикатора, добавленного к сорбенту. После просмотра пластинок в УФ-свете их обрабатывают реактивом или последовательно несколькими реактивами в соответствии с утвержденными методиками. После обработки реактивами отмечают положение и окраску хроматографических зон.

Основной качественной характеристикой вещества в ТСХ является значение *R~f~*, расчет которого проводят по формуле

R~f~ = *L~x~* / *L~s~*,

где *L~x~* — длина пробега центра хроматографической зоны исследуемого соединения; *L~s~* — длина пробега фронта растворителя. Иногда данную величину представляют в процентах, для этого полученный результат умножают на 100.

Для снижения влияния на получаемые результаты факторов, обусловленных условиями проведения исследования, часто используют относительную величину *R~s~* (*RR~f~*), которая представляет собой отношение значения *R*~f~ исследуемого вещества к значению *R~f~* стандарта-метчика, специально подобранного для этой цели и анализированного одновременно с образцом.

Для идентификации различных классов веществ методом ТСХ используют несколько аналитических образцов сравнения (обычно четыре), причем значения их *R~f~* равномерно распределяются по пластине.

Величины R~*f*~ и RR~*f*~ *для конкретного вещества в конкретных условиях хроматографирования* являются его физико-химическими константами, такими же, как точка кипения или плавления, константа ионизации и др.

На воспроизводимость *R~f~* влияют следующие факторы:

* условия проведения эксперимента, т. е. конструкция используемой хроматографической камеры, способ ее герметизации, степень насыщения камеры парами растворителя, температура и влажность окружающей среды в момент проведения исследований и т.д.; * свойства хроматографической системы, т. е. тип и способ химической обработки использованного сорбента, величина зернения и толщина слоя сорбента; тип подложки, на которую нанесен сорбент; вид и количество внесенных в сорбент вспомогательных веществ (связующие компоненты и флуоресцирующие вещества); метод активации сорбента (например, выдерживание при повышенной температуре); способ обработки пластины импрегнирующими буферами, щелочами или кислотами, а также веществами, модифицирующими ее свойства; * методические подходы к проведению хроматографирования, т. е. способ нанесения образца на пластину и использованное при этом устройство; размеры начальной зоны хроматографирования; полярность растворителя, применяемого для нанесения образца, и его количество; продолжительность исследования и величина пробега растворителя; состав и чистота растворителя и другие параметры.

Представление результатов исследований. В экспертном заключении полученные рассматриваемым методом результаты должны содержать подробное описание условий проведения эксперимента.

Для хроматографических пластин указывают:

* сорбент (во многих случаях фирмы-изготовители шифруют информацию о своей продукции под фирменными названиями, например Silufol и Сорбфил или Сорбитон, в этом случае достаточно привести название полностью); * наличие или отсутствие индикатора в составе сорбента; * использованное связующее вещество; * тип подложки для сорбента, фирма-изготовитель; * способ специальной обработки пластин перед исследованием (например, высушивание при повышенной температуре или импрегнирование щелочью или буфером).

Для систем растворителей приводят состав:

* качественный; * количественный.

Указывают способ хроматографирования:

* вертикальный (обычно опускается); * горизонтальный; * круговой; * многомерный.

Указывают особые приемы:

* хроматографирование без насыщения камеры; * хроматографирование при повышенной температуре и др.

Схема *обработки* хроматографических пластин включает:

* описание использованных реактивов, их качественный и количественный состав; * последовательность и продолжительность проведения этапов обработки; * интенсивность окраски хроматографических зон исследуемых веществ после обработки каждым реактивом; * величины R~f~ или RR~f~ исследуемых веществ.

При проведении частных исследований на конкретное вещество (направленный скрининг) указывается, что в данных условиях величина *R~f~* и окраска хроматографической зоны исследуемого вещества использованными реактивами совпадают с величиной *R~f~* и окраской аналитического образца сравнения.

В заключении обязательно приводятся данные о пределе обнаружения метода.

Такой методический подход используют для подтверждения (или отрицания) присутствия конкретного вещества в исследуемом образце (направленный скрининг).

Положительные результаты ТСХ-скрининга обязательно подтверждают аналитическими методами, основанными на других физико-химических принципах.

ТСХ-скрининг имеет *отрицательное химико-токсикологическое значение*, т. е. при получении отрицательных результатов дальнейшее исследование другими методами не проводится, а в отношении исследуемого образца делается заключение о том, что он не содержит токсикологически значимых веществ.

Метод ТСХ, позволяющий получать информацию о качественном и полуколичественном содержании компонентов, присутствующих в исследуемых объектах, находит наибольшее применение при проведении экспертизы на содержание наркотических средств, психотропных веществ и пестицидов (см. гл. 6 и 7).

*Скрининговое исследование образца неизвестной природы (ненаправленный скрининг). Э*кспертная практика последних лет показала, что правоохранительные органы и обслуживающие их криминалистические подразделения все чаще сталкиваются в своей работе с новыми, ранее неизвестными для них объектами и веществами. Нередки случаи, когда впоследствии такие средства попадают в разряд контролируемых психотропных веществ или наркотических средств (см. гл. 6). В этом случае проводят исследование образцов неизвестного происхождения и используют другой методический подход, чем приведенный выше. *Суть такого подхода заключается в применении ограниченного количества стандартизированных хроматографических систем и проявляющих реактивов*. Метод ТСХ позволяет получить гораздо больше информации об исследуемом веществе при использовании этого подхода.

Хроматографические системы подбирают с учетом получения максимально эффективных результатов, воспроизводимых от опыта к опыту и от лаборатории к лаборатории.

Критерии выбора оптимальных условий хроматографирования

Предел обнаружения метода. Хроматографические системы и проявляющие реактивы должны подбираться с учетом получения сравнимых результатов при использовании каждой из выбранных систем. Поскольку чувствительность обнаружения веществ методом ТСХ зависит от природы самих веществ и применяемых реактивов, пределы обнаружения в каждой из используемых стандартных систем должны быть близки.

Время проведения исследований, которое зависит в основном от вязкости конкретной системы растворителей, должно быть примерно одинаковым для всех используемых систем.

Стандартизированные системы растворителей должны давать равномерное распределение значений *R~f~* исследуемых веществ по хроматографической пластине и *высокую воспроизводимост*ь *R~f~*. Обычно хроматографические системы подбираются таким образом, чтобы утроенная ошибка измерения *R~f~* не превышала 10%. У выбранных хроматографических систем *коэффициент корреляции должен быт*ь *минимальным*, что обеспечивает бóльшую производительность работы.

Предложен способ математической оценки хроматографической системы с использованием расчета дискриминирующей и идентификационной силы.

Дискриминирующая сила (*DP*) определяется как вероятность того, что два вещества, взятых случайным образом из общего числа анализируемых веществ, могут быть отделены друг от друга в данной конкретной системе ТСХ с учетом утроенной ошибки определения *R~f~~.~* Расчет *DP* производится по формуле

$$DP = 1 - \frac{2M}{N(N-1)},$$

где *M* — количество пар веществ, которые в данной системе разделены быть не могут с учетом утроенной ошибки определения *R~f~*; *N* — общее количество исследуемых веществ в данной системе.

Идентификационная сила (*IP*) представляет собой вероятность идентификации вещества по значениям *R~f~* для конкретной хроматографической системы или комбинации систем. Она обратно пропорциональна средней длине списка кандидатов на идентификацию в выбранных условиях (*MLL*), которая чем ближе к единице, тем большее число веществ может разделить данная система. *При MLL* = 1 *каждое анализируемое вещество в рассматриваемых условиях проведения эксперимента обладает уникальными, только ему присущими свойствами.*

Ниже приведены некоторые наиболее распространенные хроматографические системы для анализа наркотиков (табл. 5-6) и значения *R~f~* некоторых наркотиков и их аналогов в этих системах (табл. 5-7).

Результаты расчета *DP* для приведенных в табл. 5-8 значений *R~f~* показывают, что при увеличении числа используемых хроматографических систем этот коэффициент увеличивается. Например, для систем 1 и 3 он составляет 0,860; для систем 1 и 2 – 0,917; для систем 1, 2 и 3 – 0,967; а для систем 1, 2, 3, 4 – 0,980.
При использовании всех пяти систем только два вещества: кодеин и этилморфин — не могут быть отделены друг от друга на основании значений *R~f~* в пределах ошибки их измерения. В этом случае *DP* составляет 0,997.
Обработка пластин для хроматографии проявляющими селективными реактивами резко повышает вероятность идентификации веществ.

Таблица 5-6. Хроматографические системы, стандартные ошибки определения *R~f~* и вероятность разделения в этих системах двух случайно выбранных веществ (*DP*)

Номер системы	**Фаза**		**Стандартная ошибка**	***DP***
	подвижная	**неподвижная**	***R~f~* ~,~ %~**	
1	Метанол–аммиак (100:1,5)		7	0,673
2	Циклогексан–толуол–диэтиламин (75:15:10)	Силикагель, обработанный 0,1 М раствором KOH	7	0,757
3	Хлороформ–метанол (9:1)		11	0,760
4	Толуол–ацетон–этанол–аммиак (45:45:7:3)	Силикагель	7	0,810
5	Метанол–вода–концентрированная соляная кислота (50:50:1)	Силикагель *RP*-18	9	0,770

Таблица 5-7. Значения *R~f~* некоторых психотропных веществ, наркотиков и их аналогов

Вещество	**Значения *R~f~* в стандартных системах (см. табл. 5-7)**				
	№ 1	**№ 2**	**№ 3**	**№ 4**	**№ 5**
Амитриптилин	51	55	32	52	9

Амфетамин	43	15	9	44	56
Бензоилэкгонин	21	0	1	0	41
Бупренорфин	76	9	68	76	19
Героин	47	15	38	38	43
Диазепам	75	23	73	73	32
Димедрол	55	45	33	49	19
Кетамин	63	37	63	72	46
Клофелин	62	8	31	63	59
Кодеин	33	6	18	17	61
Кокаин	65	47	47	73	34
ЛСД	60	3	39	47	26
МДА	39	17	12	45	51
Мескалин	20	4	10	23	61
Метадон	48	61	20	55	10
Метаквалон	70	37	80	72	27
Метамфетамин	31	28	13	15	52
Метилфенидат	57	34	34	57	38
Морфин	37	0	0	11	77
Налоксон	65	9	66	54	70
Налорфин	59	1	23	33	71
Никотин	54	39	35	47	93
Норпсевдоэфедрин	42	25	5	62	65
Носкапин	64	22	74	76	34
Папаверин	61	8	65	61	28
Псевдоэфедрин	33	54	4	72	63
Фентанил	70	45	74	77	19
Флуазепам	62	30	48	65	24
Эрготамин	63	1	34	40	12
Этилморфин	40	7	22	18	53
Эфедрин	30	5	5	08	63

В настоящее время описаны такие идентификационные системы, включающие хроматографические параметры для большого числа наркотиков, лекарств и прочих соединений, общее количество которых может составлять от нескольких десятков до нескольких сотен наименованийВ справочнике «Наркотические средства и психотропные вещества, контролируемые на территории Российской Федерации» (Е. А. Симонов и др.) приведены параметры удерживания большого числа наркотических средств, психотропных и сильнодействующих веществ в 10 хроматографических системах..

Стандартизация метода позволяет подбирать системы растворителей, пластины и проявляющие реагенты для определения большого числа — до нескольких сотен — различных токсикантов и их метаболитов в биологических и других сложных объектах.

Количественное определение

Способы количественного (полуколичественного) определения методом ТСХ:

* без элюирования токсикантов с хроматографической пластины, т. е. непосредственно на хроматографической пластине; * после элюирования токсикантов с хроматографической пластины

(в дальнейшем можно использовать химические или физико-химические методы определения концентрации токсиканта в полученном элюате).

Достаточно успешно можно использовать аппаратурную ТСХ *(денситометрическое определение)*. При равной эффективности и информативности с ВЭЖХ аппаратурная ТСХ обладает большей производительностью, меньшей стоимостью оборудования и вспомогательных материалов, что подтверждают приведенные ниже методики.

Количественное определение основных компонентов опия и героина. Метод ТСХ давно и широко используется для анализа опия, главным образом для идентификации компонентов наркотика и в лучшем случае для полуколичественного определения. Денситометрия в УФ-области света хроматографических зон, полученных на пластинах для высокоэффективной ТСХ, а также некоторые методические подходы к нанесению пробы позволяют значительно снизить ошибку метода. После соответствующей пробоподготовки образца (см. гл. 4 и 6) проводят хроматографирование в системах (см. табл. 5-6) с пробегом растворителя не менее 8 см:

система № 1: толуол–ацетон–этанол–аммиак (45:45:7:3);

система № 2: хлороформ–ацетон–этанол–аммиак (20:20:3:1);

система № 3: толуол–диэтиламин–этанол (9:1:1).

После удаления остатков растворителя пластину денситометрируют при 280 нм. В табл. 5-8 представлены максимумы отражения и значения *R~f~* основных компонентов опия. В зависимости от использованной системы максимумы отражения веществ могут незначительно изменяться в пределах ошибки в 4 нм.

На рис. 5-15 представлен спектр отражения кодеина, выделенного с помощью системы № 2 из образца героина.

Приведенная выше методика может применяться для количественного определения героина в анализируемом образце (криминалистическая экспертиза). На рис. 5-16 приведена денситограмма метанольного раствора героина (5 мг / мл), полученная при сканировании пластины при λ = 280 нм после разделения в системе № 2 образца героина.

Таблица 5-8. Максимумы отражения и значения *R~f~* компонентов опия

Вещество	**Максимумы отражения, нм**					**Значения *R~f~* в системах**		
	№ 1	**№ 2**	**№ 3**	**№ 4**	**№ 5**	**№ 1**	**№ 2**	**№ 3**
Героин	207	280	312	—	—	0,38	—	—
Гидрокодон	208	218	293	—	—	0,14	0,34	0,47
Гидрокотарнин	217	225	320	—	—	0.58	—	—
Дигидрокодеин	212	222	245	293	—	0,09	0,26	0,43
Кодеин	216	226	295	—	—	0,19	0,27	0,45
Криптопин	208	218	295	245	—	0,51	0,76	0,63
Меконин	217	225	320	—	—	0,73	—	—
Морфин	219	229	297	—	—	0,09	0,15	0,20
Наркотин	217	225	322	—	—	0,70	0,78	0,67
Оксикодон	209	218	292	—	—	0,53	0,74	0,63
Папаверин	239	249	291	211	335	0,58	0,72	0,60
Тебаин	286	296	216	236	—	0,30	0,47	0,64
Этилморфин	217	226	295	—	—	0,19	0,38	0,46

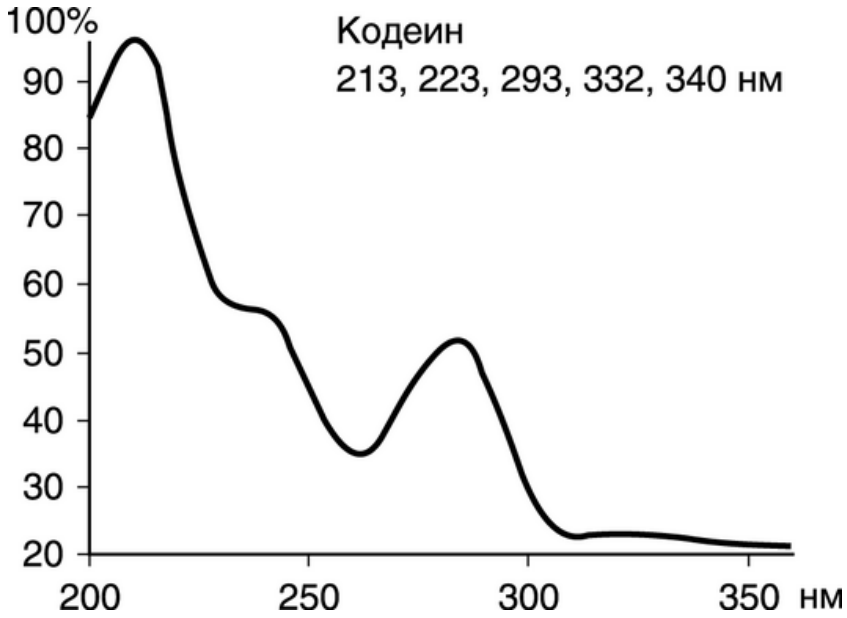


Рис. 5-15. Спектр отражения кодеина, выделенного с помощью системы № 2 из образца героина

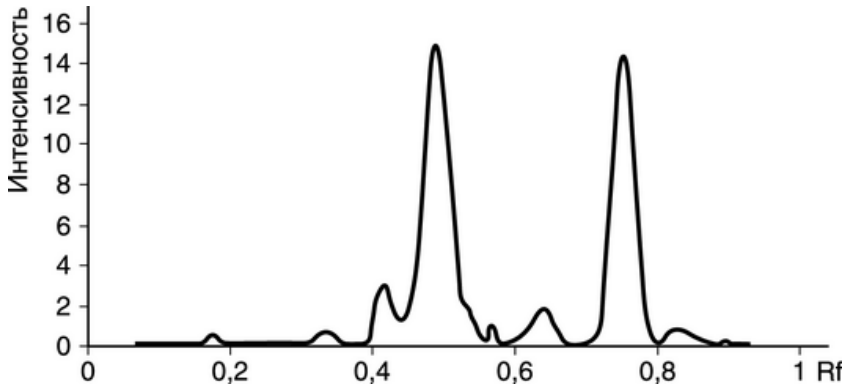


Рис. 5-16. Денситограмма героина при λ = 280 нм

В результате проведенного исследования в данном образце установлено присутствие 46,6±1,6% диацетилморфина (героина), 29,8±2,0% наркотина и 2,6±0,4% папаверина. Результаты денситометрического определения этих веществ совпали в пределах 5% ошибки с результатами газохроматографического исследования.

Многие наркотики можно анализировать методом ТСХ *на уровне долей нанограмма* после обработки их реактивами для получения флуоресцирующих продуктов. Количественное определение морфина, амфетамина и первитина *на поверхности различных предметов* (криминалистическая экспертиза), а также *в биологических объектах методом высокоэффективной ТСХ дансильных производных* основано на сравнении интенсивности флуоресценции хроматографических зон исследуемых объектов и стандартных растворов с применением денситометра или визуально.

Основные способы проведения дансилирования исследуемых веществ

Прямое дансилирование, например, морфина: к 5 мл водного раствора образца или калибровочного раствора добавляют 200 мг карбоната натрия и 0,2 мл 0,1% раствора дансилхлорида в ацетоне. Полученную смесь выдерживают 1,5–2 ч при комнатной температуре в темном месте. После этого ее экстрагируют 2 раза 5 мл хлороформа. Хлороформные экстракты объединяют, сушат над безводным сульфатом натрия и упаривают досуха на роторном испарителе или в токе азота при температуре 40 °С.

Экстрактивное дансилирование дает большой выигрыш во времени и имеет больший процент извлечения. Экстрактивное дансилирование, например, морфина: к 5 мл водного раствора образца или калибровочного раствора добавляют 0,1 мл 0,2 М раствора тетрабутиламмония гидроксида в 1 М растворе NaOH и 0,2 мл раствора дансилхлорида в хлороформе (1 мг / мл). Смесь встряхивают в течение 10 мин. Слой органического растворителя

сушат над безводным сульфатом натрия и упаривают досуха на роторном испарителе или в токе азота при температуре 40 °С.

Дансилирование сухих остатков, например морфина, после экстракции из биообразца: сухие остатки растворяют в 5 мл подкисленной воды. Далее поступают, как в описании прямого или экстрактивного дансилирования. Представленные варианты методик применимы только к морфину.

Для получения воспроизводимых результатов *перед хроматографированием исследуемых проб* пластины дважды хроматографируют в метаноле и сушат при комнатной температуре до полного удаления следов растворителя.

При исследовании сильно загрязненных образцов, например экстрактов из волос или ногтей, перед хроматографированием в основной системе пластину хроматографируют несколько раз в толуоле или ацетоне. После каждого цикла хроматографирования ее сушат на воздухе. Последнее (окончательное) хроматографирование проводят в системах, указанных в табл. 5-9.

Таблица 5-9. Хроматографические системы и значения *R~f~* дансильных производных исследуемых веществ

Хроматографическая система	Значения *R*~f~ дансильных производных		
	морфина	амфетамина	первитина
Метанол — 25% аммиак (100:1,5)	0,60	—	—
Ацетон–хлороформ–этанол: 25% аммиак (20:20:3:1)	0,81	—	—
Циклогексан–толуол–диэтиламин (7,5:1,5:1,0)	—	0,56	0,78

При сравнении эффективности приведенных методик дансилирования наилучшие результаты показал способ экстрактивного дансилирования с использованием хлороформа в качестве экстрагента. Предел обнаружения дансилморфина составил 0,5 нг в пятне, дансильных производных амфетамина и первитина — 2,5–5,0 нг в пятне.

Применение метода ТСХ рассматривается в главах 6–10 при обсуждении ХТА различных групп токсикантов.

5.3.3. Газовая хроматография

Произведение оптимизма на знания –
величина постоянная.

Лев Ландау (1908–1968), выдающийся советский физик-теоретик, лауреат Нобелевской премии по физике (1962)

Как много дел считались невозможными,
пока они не были осуществлены.

*Гай Плиний Секунд,
или Плиний Старший (22–79 гг н.э.),
древнеримский писатель-энциклопедист, историк*

Газохроматографический метод анализа подразделяют на два основных вида в зависимости от природы неподвижной фазы:

* газоадсорбционная хроматография (ГХ), в которой неподвижная фаза — адсорбент; молекулы вещества выделяются из подвижной фазы — газа главным образом — за счет электростатических сил; * ГЖХ, в которой неподвижная фаза — слой жидкости, покрывающей и химически связанной с поверхностью инертного носителя или стенки колонки; разделение смеси веществ происходит за счет разности их растворимости в неподвижной фазе.

Однако с распространением капиллярных колонок, где неподвижная фаза химически связана с внутренней поверхностью колонки, такое разделение трудно провести.

Сущность метода. В середине 50-х годов XX в. группой датских инженеров была начата работа по изучению процессов, приводящих к размыванию хроматографических пиков. Было выведено уравнение, известное в настоящее время как *уравнение Ван-Деемтера*, связывающее ВЭТТ (высота, эквивалентная теоретической тарелке) с экспериментальными характеристиками, такими как диаметр частиц стационарной фазы, коэффициенты диффузии веществ в неподвижную и подвижную фазы, скорость движения подвижной фазы и др.

Упрощенный вид уравнения Ван-Деемтера:

$$\text{ВЭТТ} = A + B/\mu + C\mu,$$

где *A* — коэффициент вихревой диффузии, определяющий влияние на размывание хроматографической зоны плотности и равномерности упаковки колонки неподвижной фазой, размера и формы зерен носителя (неправильная или сферическая) и других факторов. При использовании современных носителей и колонок, изготовленных промышленным способом, влияние этих факторов на эффективность разделения незначительно. Для капиллярных газохроматографических колонок коэффициент *A* равен нулю; *B* — коэффициент продольной диффузии, учитывающий размывание хроматографической зоны за счет градиента концентрации вещества в центре и по ее краям. Влияние этого коэффициента значительно при малых скоростях потока и более выражено для газовой хроматографии, чем для жидкостной. Уменьшить его влияние можно правильной установкой скорости расхода и увеличением вязкости подвижной фазы; *C* — коэффициент массопереноса вещества между двумя фазами; μ — линейная скорость потока подвижной фазы.

Подвижная фаза обогащается определяемым веществом главным образом во фронтальной части его хроматографической зоны, что связано с движением подвижной фазы и конечной скоростью установления равновесия между фазами. Влияние этого фактора на эффективность разделения и размывание хроматографических зон прямо пропорционально линейной скорости потока подвижной фазы. Эффект становится значимым для капиллярных газохроматографических колонок, имеющих очень тонкий слой неподвижной фазы.

Современные газохроматографические колонки имеют эффективность в сотни ТТ, а капиллярные — свыше 10 000 ТТ. ВЭТТ на 1 м колонки с 10 000 ТТ составляет 0,01 см на 1 тарелку. Для сравнения: эффективность для современных ВЭЖХ-колонок (см. ниже) находится на уровне до 400 ТТ на 1 см колонки, что соответствует их длине от 10 до 50 см.

Итак, ГХ широко применяется в аналитической токсикологии в силу нескольких важных достоинств метода. Во-первых, возможно использовать чувствительный надежный универсальный детектор ПИД. Во-вторых, применяются и коммерчески доступны стабильные высокоэффективные аналитические колонки. В-третьих, ГХ легко объединять с методами исследования вещества, которые позволяют однозначно определять их.

Преимущества метода**:**

* широкий выбор стабильных, эффективных капиллярных колонок; * надежные чувствительные универсальные (ПИД) и селективные (МС) детекторы; * высокая скорость выполнения многокомпонентного анализа — от считанных минут до 1–2 ч; * высокая разрешающая способность; * высокая чувствительность метода, позволяющая детектировать 10^–8^–10^–13^ г; * неразрушающий метод, легко объединяемый с другими физико-химическими методами анализа, например МС или ИК-Фурье-спектроскопией; * получаемые результаты высоковоспроизводимы за счет использования нормализованных данных удерживания (индексы Ковача); * применим для анализа большого количества газов и растворителей; * возможность хирального анализа; * метод количественного определения, ошибка которого составляет обычно 1–5%; * для проведения исследования требуется малое количество пробы, обычно несколько микролитров; * надежный метод; * относительно простой метод; * относительно недорогой метод.

Недостатки метода:

* применение метода ограничивается летучестью образцов и нестабильностью аналита при температуре анализа (около 400 °C); * метод не подходит для термолабильных веществ; * затруднено проведение препаративных работ; * необходимо использовать дополнительное оборудование для подтверждения полученных результатов.

Самостоятельное направление ГХ, которое характеризуется специфическими методиками (в результате химической трансформации анализируемой смеси образуются новые соединения, что приводит к изменению коэффициентов разделения и чувствительности детектирования), особой областью применения, особенностями аппаратуры, носит название *аналитическая реакционная ГХ.*

Оборудование для газовой хроматографии

Система газового хроматографа состоит из следующих элементов:

* устройство подачи газа, которое контролирует подачу газа-носителя (подвижную фазу) в колонку, а также сжатого воздуха и азота в детектор; * система ввода проб (инжектор); * аналитическая колонка; * детектор; * система получения и обработки данных.

Детекторы

В ГХ применяются разнообразные детекторы. Наибольшее распространение получили ПИД и масс-спектрометрический (МС) детектор. Кроме инфракрасного детектора с преобразованием Фурье, все ГХ детекторы относятся к деструктивным. Детектор электронного захвата позволяет с высокой чувствительностью и селективностью определять соединения, содержащие атомы галогенов. Однако его применение ограничено в силу необходимости использования радиоактивного источника и позже было вытеснено МС в отрицательной области. При этом азотно-фосфорный детектор, чувствительный к аналитам, содержащим C—N связь или фосфор, несмотря на сложность использования, широко применяется в аналитической химии. Фотометрический пламенный детектор (ФПД) применяется при определении соединений, содержащих фосфор или серу. Фотоионизационный детектор (ФИД) обладает схожей с ПИД чувствительностью, при этом для его работы не требуется газ, что нашло применение в исследованиях окружающей среды.

1. Детектор теплопроводности (катарометр).

Первым детектором для ГХ был катарометр, или детектор теплопроводности. Он обладает низкой чувствительностью и нелинейным диапазоном, но применяется в аналитической токсикологии при анализе монооксида углерода и соединений, определение которых МС затруднено или невозможно. Принцип действия данного детектора основан на изменении сопротивления нагретого электричеством филамента под воздействием выходящего из колонки газа.

2. ПИД.

Работа ПИД основана на изменении ионизации пламени водорода и воздуха из-за изменения состава выходящего газа. Данный тип детектора характеризуется высокой чувствительностью, хорошей стабильностью и широким линейным диапазоном. Детектор не чувствителен к присутствию воды в пробе, поэтому с его помощью можно определить этанол. Для работы ПИД необходимо поддерживать температуру не менее 125 °C, чтобы предотвратить образование водяного пара.

3. АФД.

АФД имеет такое же строение, как и ПИД, но над пламенем располагается нагревательный элемент с рубидиевым или стеклянным сердечником. Этот детектор обладает высокой чувствительностью к соединениям, содержащим атом фосфора или связь C–N, благодаря чему он, в частности, применяется при исследовании фосфорорганических пестицидов (ФОП) и их метаболитов.

4. Детектор электронного захвата.

Работа детектора электронного захвата основана на эмиссии электронов нестабильным изотопом (^63^Ni) или за счет разряда плазмы и последующем селективном захвате электронов потоком выходящего газа. В результате снижается постоянное напряжение между источником и собирающим электродом. Детектор электронного захвата – один из самых чувствительных детекторов для соединений, содержащих атомы галогена или азота или карбонильную связь, поэтому им определяют галоген-содержащие растворители, пестициды и некоторые галоген- или азотсодержащие лекарственные средства, например, бензодиазепины. Он более чувствителен, чем МС-детектор, и способен определять количество вещества до нескольких фемтограмм (10^-15^ г), что используется при определении хлорорганических пестицидов. При этом его использование сопряжено с рядом сложностей: детектор легко загрязняется, для работы требуется большое количество газа, ограниченная широта линейного диапазона, ограниченный круг пригодных для анализа аналитов, а также небезопасные условия работы, если в качестве источника электронов используется ^63^Ni — источник сильного β-излучения.

5. Детектор ионизации импульсным разрядом.

Детектор работает в трех режимах, которые различаются по способу создания импульсного разряда: фотоионизация гелием, электронный захват, ионизационная эмиссия гелием. В режиме фотоионизации гелий проходит через камеру детектора, возникает разряд и испускаются заряженные фотоны, которые проходят через камеру и ионизируют газовую смесь исследуемого образца. Образующиеся ионы регистрируются электродами и измеряются стандартным электрометром. Таким образом можно определить кислород, водород и азот, летучие неорганические соединения, которые не могут быть определены ПИД. Чувствительность этого детектора сопоставима с детектором электронного захвата, но при этом при его использовании не требуется соблюдения особой техники безопасности.

6. Пламенный фотометрический детектор.

Работа детектора основана на хемилюминесценции серы или фосфора при нагревании в пламени, что обеспечивает относительно специфическое обнаружение веществ, содержащих эти элементы. Он не используется в аналитической токсикологии, но применяется при разработке пестицидов.

7. Атомно-эмиссионный детектор.

Микроволновый детектор индуцированной плазменной эмиссии, или атомно-эмиссионный детектор, пригоден для одновременного и селективного измерения около 15 элементов. Аналиты, выходящие из колонки ГХ, попадают в полость микроволновой плазмы, где отдельные атомы возбуждаются под действием тепловой энергии плазмы. Каждый элемент излучает свет определенной длины волны при распаде из возбужденного состояния, что может быть измерено с помощью фотодиодной матрицы. Соответствующий компьютер может создавать хроматограммы, состоящие из пиков аналитов, содержащих только определенный элемент. Атомно-эмиссионный детектор в сочетании с МС применяется как в фармацевтическом анализе, так и в аналитической токсикологии.

8. Хемилюминесцентный азотный детектор.

Хемилюминесцентный детектор азота характеризуется линейным и эквимолярным ответом на соединения азота. При помощи горелки из нержавеющей стали поддерживается высокотемпературное сгорание азотсодержащих соединений с образованием оксида азота (NO). Фотоэлектронный умножитель обнаруживает свет, образующийся в результате последующей хемилюминесцентной реакции NO с озоном. Благодаря специфичности реакции анализ образцов со сложными матрицами возможен с минимальными помехами или вообще без них. ГХ с таким детектором можно использовать для количественного определения при отсутствии стандартных образцов, если известно количество атомов азота в молекуле определяемого вещества. Эта особенность нашла применение для анализа новых психоактивных соединений.

9. Фурье-ИК детектор.

Использование ИК-спектроскопии в качестве детектора ГХ стало практически осуществимым только с развитием приборов с преобразованием Фурье, которое позволяет представить данные графика зависимости интенсивности от времени в виде спектра зависимости интенсивности (% пропускания) от частоты. ГХ-Фурье-ИК-спектроскопия не

получила широкого распространения в аналитической токсикологии из-за высокой стоимости и ограниченного изомерами и летучими растворителями круга анализируемых соединений. Однако использование данного детектора не разрушает пробу и позволяет проводит как качественное, так и количественное определение, хоть и при относительно небольшой чувствительности (не менее 10 нг). Если раньше ГХ-Фурье-ИК-спектроскопия использовалась для определения летучих соединений в крови, то сегодня метод используется для определения синтетических каннабиноидов и катинонов.

10. Вакуумный УФ-детектор (ВУФ).

ВУФ дополняет спектральную информацию, получаемую при помощи МС. В отличие от Фурье-ИК-детектора ГХ-ВУФ больше похож на МС детектор из-за сходных параметров чувствительности, линейности и возможности количественного определения. Хотя спектры ВУФ в меньшей степени, чем ИК, отражают структуру исследуемого соединения, идентификация молекулы возможна благодаря поиску по библиотеке спектров. Дейтериевая лампа ВУФ-детектора позволяет получать спектры в диапазоне 120–400 нм. В системе с таким типом детектора обычно используются гелий, аргон или водород.

ГХ-ВУФ используется для идентификации изомеров и летучих органических соединений, в частности взрывоопасных нитроэфиров, замещенных катинонов, аналогов фентанила и структурных изомеров МДМА.

Аналитические колонки и их наполнитель

Неподвижные фазы

Существует большое количество неподвижных фаз для ГХ, но наибольшее распространение получили производные полисилоксанов и полиэтиленгликоля. Фазы, содержащие полиэтиленгликоль, могут отличаться большей селективностью к определенным соединениям, но в целом они характеризуются меньшей интенсивностью, меньшими температурными пределами и меньшим сроком службы.

Набивные колонки

Традиционные набивные колонки из боросиликатного стекла, нержавеющей стали или нержавеющей стали со стеклянным покрытием все еще находят применение в некоторых областях. Хотя они менее прочны, чем стальные, стекло менее склонно к адсорбции или реакции с полярными аналитами. Кроме того, любое оседание упаковки и загрязнение колонки можно проверить визуально.

Набивные колонки используются в газоадсорбционной хроматографии для анализа газов и растворителей. Синтетический цеолит и силикагель используются для анализа газов воздуха и угарного газа.

Капиллярные колонки

В большинстве случаев в аналитической токсикологии используются капиллярные аналитические колонки с силикагелем. Внешняя полиамидная оболочка защищает хрупкий силикагель, придавая конструкции механическую прочность при сохранении гибкости. Капиллярные колонки хранятся в свернутом виде в металлическом каркасе. Обращение с ними должно быть аккуратным, так как при ударе они могут внезапно выпрямиться и поранить человека. Полиамидная оболочка также повышает рабочую температуру колонки до 360–400 °C. Такие колонки в меньшей степени подвержены протечкам, что, как следствие, снижает уровень шума в детекторе благодаря меньшему количеству неподвижной фазы, чем в набивной, и тому, что неподвижная фаза химически связана и сшита со стенкой капилляра при помощи поверхностных силанолов.

Важным преимуществом капиллярных колонок является низкая тепловая масса, что облегчает программирование температуры. Обычно в начале программы допускается короткий период («задержка растворителя») для того, чтобы чтобы растворитель для инжекции успел вытечь из колонки до повышения температуры печи. Также упрощается взаимодействие с МС детектором, так как уменьшается скорость потока газа-носителя. Еще одним преимуществом по сравнению с набивными колонками является то, что при использовании неподвижных фаз с полисилоксаном накопление кремниевых отложений на детекторе сводится к минимуму. Но с другой стороны, при

использовании любого другого, кроме МС, детектора, требуется более высокая скорость потока газа-носителя, поэтому в таком случае потребуется дополнительная подача газа.

Капиллярные колонки различаются по диаметру капилляра и толщине слоя неподвижной фазы, но стоит учитывать, что эффективность колонки повышается с уменьшением диаметра колонки и толщины слоя, но при этом уменьшается объем рабочей нагрузки и возрастает риск перегрузки колонки и размывания пика.

Идентификация веществ на основе данных газовой хроматографии

Идентификация веществ в ГХ основывается на возможности метода разделять сложную смесь на индивидуальные компоненты, последовательно выходящие из колонки в смеси с газом-носителем. В зависимости от цели экспертизы возможно решение следующих задач:

* соотнесение хроматографических пиков разделяемых веществ с компонентами смеси, состав которой ориентировочно известен, например, при исследовании многокомпонентного лекарственного препарата; * проведение группового анализа; * частичная идентификация компонентов смеси.

В зависимости от сложности поставленной задачи для ее решения используются как различные хроматографические приемы, так и приемы с привлечением данных других методов: химических, физико-химических, биологических и т.д.

Поскольку для каждой конкретной хроматографической системы *время удерживания* является физико-химической константой вещества, такой же, как температура кипения или плавления, то совпадение в пределах ошибки измерения экспериментально установленных значений параметров удерживания разделяемых соединений с приведенными в литературе значениями этих параметров для известных веществ может быть основанием для его идентификации. По крайней мере, отсутствие такого совпадения говорит о том, что данного вещества в исследуемой смеси нет. Этот подход дает хорошие результаты при использовании данных, полученных с применением нескольких различающихся по своим свойствам, главным образом по полярности, хроматографических неподвижных фаз.

Для гомологических рядов органических соединений достаточно просто рассчитываются корреляционные зависимости параметров удерживания. На основании этого можно проводить проверку соответствия экспериментально полученного пика времени удерживания конкретного члена такого ряда. Современное программное обеспечение для компьютеров на основе термодинамических данных и структурной формулы вещества позволяет достаточно точно рассчитать индекс удерживания для большинства веществ.

Простейший способ установления наличия в смеси какого-либо вещества — использование эталонных образцов сравнения. Стандарт анализируют отдельно от смеси или добавляют его в смесь. В обоих случаях наличие хроматографического пика или увеличение его высоты и площади говорит о возможном присутствии в смеси этого вещества.

Большой выбор селективных газохроматографических детекторов или использование сложных многоколоночных систем позволяет по соотношению их откликов и набору времен удерживания на разных колонках проводить идентификацию веществ. Такой подход наиболее часто используется в анализе объектов окружающей среды и биологических объектов на присутствие пестицидов различного происхождения.

Получение данных удерживания анализируемого вещества до и после обработки его различными дериватизирующими реактивами позволяет по совпадению времен удерживания неизмененного вещества и его производного оценивать присутствие данного вещества в пробе.

Более детальную информацию о пробе получают, используя приемы, предусматривающие препаративный сбор фракций, выходящих из газохроматографической колонки, и их последующее исследование с применением других методов анализа.

Исследование биологических объектов предоставляет еще одну возможность идентификации вещества — по присутствию в пробе его метаболитов. Например, обнаружение в моче наркотического средства метамфетамина

по международным правилам требует подтверждения наличия в данной пробе и его основного метаболита — амфетамина. Такая же ситуация наблюдается и с другими наркотиками, например героином и 6-моноацетилморфином, кокаином и бензоилэкгонином.

Сравнение экспериментальных и приведенных в литературе параметров удерживания. В этом случае качественными характеристиками разделяемых веществ являются определенные в заданных условиях параметры удерживания. Для идентификации при сопоставлении с опубликованными данными используют *относительные параметры удерживания — индексы удерживания Ковача* (*R~i~*).

Относительные параметры удерживания разделяемых компонентов рассчитываются из экспериментальных данных как отношение исправленного удерживаемого объема (или исправленного времени удерживания) этих компонентов к исправленному удерживаемому объему (или времени удерживания) вещества, входящего в состав разделяемой смеси (или специально введенного) и выбранного в качестве стандарта. Установленные относительные параметры удерживания сопоставляются с табличными, и по результатам сопоставления делается вывод о качественном составе анализируемой пробы.

В основе метода идентификации по индексам удерживания Ковача лежит использование *линейной зависимости* между логарифмом исправленного удерживаемого объема и числом атомов углерода в молекуле нормальных углеводородо*в.* Ковач предложил присвоить членам гомологического ряда нормальных углеводородов постоянные индексы удерживания, которые не зависят от условий процесса хроматографического разделения, всегда остаются постоянными и рассчитываются как произведение числа атомов углерода в молекуле на 100. Тогда индекс удерживания Ковача для метана оказывается равным 100, для этана — 200, для пропана — 300 и т.д.

Для идентификации вещества в строго зафиксированных условиях процесса разделения на данной неподвижной жидкой фазе сначала определяют, например, логарифм исправленных объемов удерживания членов гомологического ряда нормальных углеводородов, которые элюируются из колонки до и после анализируемого соединения. Затем в этих же условиях определяют *R~i~* исследуемого соединения и его индекс удерживания:

$$R_i = 100\,z + 100\,\frac{t'_{ri} - t'_{rz}}{t'_{rz+1} - t'_{rz}},$$

где *z* — число атомов углерода в алкане; *t´~ri~*, *t´~rz~*, *t´~rz~~*+1~ — исправленные времена удерживания вещества и алканов.

Для корректного *сопоставления результатов* анализа измерения выполняют в условиях, идентичных тем, при которых получены опубликованные данные, особенно по следующим показателям:

* тип насадки (марка, фирма-изготовитель, количество неподвижной жидкой фазы и характеристики твердого носителя, условия предварительной активации или обработки насадки, условия кондиционирования колонки); * температурный режим колонки; * система ввода пробы; * параметры (длина, диаметр, материал) колонки; * условия предварительной подготовки колонки; * объем вводимой пробы; * расход, входное и выходное давление газа-носителя; * способ измерения «мертвого» времени.

Для насадочных колонок с содержанием 15–20% неполярной неподвижной жидкой фазы на твердом носителе межлабораторная воспроизводимость индексов удерживания Ковача составляет 1–3 единицы индекса, на полярных неподвижных фазах до 5 единиц, для капиллярных колонок до 1–2 единиц. При поиске параметров удерживания в литературе окно для разброса параметров принимают равным 40–50 единицам индекса.

Основные способы дериватизации

Для целей разделения, концентрирования и последующего анализа различных токсикантов в ХТА часто требуется целенаправленно изменить свойства аналита для улучшения его аналитических показателей. Такой подход принято называть дериватизацией, т. е. получением производных. Дериватизация улучшает хроматографическое

разделение, особенно низколетучих, полярных или водорастворимых веществ, увеличивает чувствительность анализа и снижает предел детектирования. Без проведения дериватизации некоторые вещества вообще нельзя было бы исследовать методом ГХ или при этом получали бы неудовлетворительные результаты. Часто дериватизация проводится с целью получения дополнительной информации о содержании токсикантов, например наркотиков, в биологических жидкостях. Производные аналитов не только эффективнее разделеляются, но и имеют более информативные и удобные для работы МС, например ацильные производные стимуляторов амфетаминового ряда. Химические способы дериватизации постоянно модернизируются, предоставляя новые возможности для аналитиков.

Аналиты с полярными функциональными группами, например фенолы, спирты или карбоновые кислоты, в системе ГХ могут элюироваться в виде нестабильных искривленных пиков, что приводит к снижению селективности и чувствительности анализа. Поэтому с целью улучшения хроматографического разделения, а также повышения параметров детектирования и идентификации соединения проводится дериватизация. С ее помощью становится возможным скорректировать время удерживания исследуемого соединения или разделить энантиомеры.

Выбор дериватизирующего реагента и условий проведения реакции определяется строением исследуемого вещества и результатом, который планируется достичь с помощью дериватизации. Наиболее распространенными механизмами дериватизации являются силирование, ацилирование и алкилирование. Механизмы дериватизации по-разному влияют на время удерживания. Например, силирование снижает время удерживания, а ацилирование увеличивает. При этом элюирование дериватизированных и недериватизированных компонентов смеси не изменяется.

При выборе способа дериватизации также важно учитывать способность аналита вступать в реакцию дериватизации, особенно при использовании внутреннего стандарта, поэтому при проведении ГХ-МС анализа рекомендуется использовать изотопно-меченные стандарты. Этап дериватизации может быть проведен в процессе пробоподготовки, либо в процессе твердофазной микроэкстракции при ГХ свободного пространства, либо после ввода пробы в аналитическую колонку.

При проведении дериватизации возможны следующие сложности: 1) необходимость удаления излишек дериватизирующего реагента; 2) вероятность распада аналита, дериватизирующего реагента, других компонентов смеси или дериватива; 3) возможность интерференции сопутствующими компонентами смеси, продуктами распада или побочными продуктами реакции. Внутриколоночная дериватизация лишена таких недостатков, но она применима для ограниченного числа аналитов. Важно отметить, что побочные продукты реакции дериватизации, например, ацилирование морфина до диацетилморфина или 6-моноацетилморфина или распад этих соединений до морфина, могут привести к недостоверным результатам.

Большинство ароматических и алифатических гидроксилов образуют силиловые эфиры при добавлении дериватизирующих реагентов с триметилсилильной группой при комнатной температуре в безводной среде.

Карбоновые кислоты обычно анализируются в виде метиловых или бутиловых эфиров. Метилирование проводится при нагреве (60–100 °C, 30 мин) исследуемой смеси с 14% раствором трифторида бора в метаноле. Метилированное производное можно экстрагировать органическим растворителем (например, гексаном) после выпаривания метанола и добавления воды. Диазометан тоже используется в качестве дериватизирующего реагента. Он быстро вступает в реакцию при комнатной температуре, излишки реагента легко удаляются выпариванием. Однако это соединение очень токсично, взрывоопасно и относится к канцерогенам.

Для первичных и вторичных аминов, а также соединений с фенильным гидроксилом используется ацилирование при помощи уксусного или пропионового ангидридов. Первичные амины реагируют с ангидридами и кетонами, например ацетоном, бензальдегидом или циклогексаноном, с образованием иминов, а вторичные амины образуют енамины. Гидразины и гидроксамины вступают в реакцию с карбонильной группой с образованием гидразонов и оксимов соответственно. Образование имина используется при анализе амфетамина, когда анализируемое соединение вступает в реакцию с ацетоном.

В процессе пробоподготовки проводятся следующие реакции дериватизации – образование эфиров, ацетилирование и алкилирование. Дериватизация может улучшать хроматографическое разделение компонентов

смеси и повышать их летучесть, но сама реакция может стать проблемой. Дериватизирующий реагент, как и любой другой побочный продукт реакции, может интерферировать по времени удерживания с аналитами. Также обычно дериватизация проводится при повышенной температуре, в результате чего происходит накопление повышенного давления внутри виалы, поэтому применяются особые вентилируемые крышки.

Этерификация

Аналиты со свободными карбоксильными группами обычно плохо разделяются методом ГХ из-за своей полярности и температурной нестабильности. Выбор способа дериватизации зависит от свойств аналита, присутствия в его молекуле других полярных групп и вида детектирующей системы, которая будет использована для определения. Существует несколько способов получения менее полярных производных карбоновых кислот.

Этерификация спиртами. Разработано большое число методик получения сложных эфиров карбоновых кислот со спиртами (от метанола до изоамилового спирта) в присутствии высоколетучих катализаторов, таких как хлороводород, тионилхлорид или ацетилхлорид, которые легко могут быть удалены вместе с избытком спирта. Жирные кислоты, кроме того, легко метилируются в присутствии фторида бора (BF~3~) в метаноле. Нормальный бутанол и его изомеры часто используются для этерификации аминокислот в присутствии хлороводорода при повышенной температуре (до 100 °C).

Пиролитическое метилирование. Четвертичные аммониевые основания, например тетраметиламмоний или триметилфениламмоний- гидроксид, растворенные в метаноле вместе с пробой, при введении в нагретый испаритель газового хроматографа образуют с органическими кислотами соединения, которые сразу же пиролитически разрушаются с образованием метиловых эфиров этих кислот. Способ широко используют в биохимии для установления жирнокислотного состава липидов; в микробиологии по липидному (жирнокислотному) составу бактериальных мембран проводится экспресс-диагностика, в том числе особо опасных микроорганизмов. Этот метод широко использовался еще в середине XX в. для метилирования барбитуратов (см. гл. 7). В настоящее время для дериватизации данным способом успешно используют фториды, цианиды или ацетаты четвертичных аммониевых катионов. Например, 3,5-бис(трифторометил)-бензил-диметил-фениламмония фторид, диметилацеталь или диметилформамид применяют для дериватизации экстрактов плазмы крови людей, принимавших клонидин или его аналоги. Считается, что эти вещества более эффективны, так как не создают щелочную среду, что может привести к необратимому гидролизу сложных эфиров.

Этерификация диазометаном. Диазометан в обычных условиях представляет собой газ желтого цвета, хорошо растворимый в неполярных растворителях. Его раствор в эфире в присутствии метанола был одним из первых дериватизирующих реактивов в ГХ жирных кислот. Обычно реактив готовят непосредственно перед исследованием, так как он крайне нестабилен и к тому же является сильнейшим канцерогеном. В настоящее время от него повсеместно отказались в пользу фенилдиазометана или триметилсилилдиазометана, гексановые растворы которых можно приобрести у ведущих химических компаний.

Этерификация галогеналканами. Алкилиодиды, алкилбромиды, реже алкилхлориды применяют для обработки солей карбоновых кислот в среде ацетонитрила, ацетона или метанола. Соответствующие сложные эфиры образуются за несколько минут с хорошим выходом и без нагревания. Производные некоторых токсикантов получают, например, по реакции с перфторбензилбромидом. Образовашиеся дериваты определяют на очень низком уровне с применением ДЭЗ или масс-спектрального детектора. Широко используется метилиодид для метилирования основного метаболита тетрагидроканнабинола в моче и его дальнейшего определения методом ГХ.

Силилирование

В 60-х годы XX в. после внедрения в практику аналитической химии силилирующих реактивов для ГХ они стали рассматриваться как *основные* реактивы для модификации полифункциональных веществ. Используя эти реактивы, модифицирование можно осуществить в 1–2 этапа. К настоящему моменту разработаны и широко применяются на практике многочисленные силилирующие реактивы, с помощью которых можно получить несколько видов производных — от триметилсилильных до *трет*-бутилдиметилсилильных и др. В зависимости от природы вещества и реагента силилирование идет с разной скоростью и выходом. Так, возможен перевод анализируемого

вещества в его полный эфир непосредственно в испарителе хроматографа, в других случаях необходима длительная обработка силилирующим агентом с последующим удалением избытка реактива и растворителя. Для определения пестицидов в объектах окружающей среды и в биообъектах иногда используют силильные реактивы, в метильных группах молекул которых один или два атома водорода заменены на бром. Получаемые с помощью такого вида реактивов производные исследуют с применением ДЭЗ или ПФД, что позволяет достичь высокой чувствительности и селективности определения анализируемых веществ.

Ацилирование

Этот способ дериватизации широко используется в ХТА для определения веществ, имеющих свободную гидроксигруппу (фенольную или спиртовую), а также ароматическую или алифатическую аминогруппу. Определение наркотиков (амфетамины, опиаты), стероидов и многих других веществ осуществляют с применением ангидридов или перфтороангидридов уксусной, пропионовой или масляной кислот. Производные фторированных кислот имеют большое сродство к электронам и поэтому определяются ДЭЗ с высокой чувствительностью. Преимуществами рассматриваемых реактивов являются их дешевизна, простота выполнения реакции, значительное улучшение хроматографических свойств аналитов. Однако обработка этими реактивами веществ, в химической структуре которых имеется несколько реакционноспособных заместителей, может привести к частичной дегидратации и/или циклизации нескольких молекул аналита, что скажется на результатах количественного определения. Иногда ангидриды кислот заменяют хлорангидридами или другими веществами, способными отщеплять ацильный фрагмент.

Присутствие в анализируемой пробе веществ, способных вызывать переэтерификацию других компонентов смеси, приводит к неправильной интерпретации полученных результатов, например, ацетилсалициловая кислота, которая легко, особенно при нагревании, ацетилирует гидроксильные и аминогруппы. Так, в незаконном обороте наркотиков часто встречаются смеси героина и ацетилсалициловой кислоты, пробы которых при газохроматографическом и хромато-масс-спектральном исследованиях дают отрицательный результат на содержание морфина, кодеина и монозамещенных морфина. В то же время при исследовании этих же образцов методами ТСХ и ВЭЖХ метаболиты указанных наркотиков однозначно определяют. Поэтому эксперты, не имеющие достаточного опыта, часто допускают грубейшую ошибку при интерпретации результатов исследования смеси ацетилсалициловой кислоты с наркотиками, особенно часто при определении амфетамина или его аналогов, делая не соответствующее действительности заключение об отсутствии в пробе контролируемых веществ.

Ацетилсалициловая кислота легко взаимодействует со спиртами, при этом получаются не ацетильные производные, а салицилаты аналитов. Эта реакция легла в основу методики разделения метилового и этилового спиртов. При добавлении в смесь этих спиртов раствора ацетилсалициловой кислоты в разогретом инжекторе образуются метил- и этилсалицилаты, которые надежно разделяются на капиллярных колонках в условиях, подобранных для анализа наркотиков. Этот подход часто используется в лабораториях, которые не занимаются анализом низкомолекулярных веществ, и поэтому перенастройка приборов на их исследование не оправдана экономически, требует отвлечения от основной работы специалистов и оборудования.

В 90-х годах XX в. в практику газохроматографического исследования вошли *новые* дериватизирующие реактивы на основе *метилхлороформиата* (*MCF*) или *этилхлорформиата* (*ECF*), которые быстро и одновременно дериватизируют как амино- и гидрокси-, так и карбоксильные группы аналита. Этот новый класс мощных дериватизирующих реактивов имеет ряд преимуществ: проведение реакции в водной среде, совмещение нескольких стадий пробоподготовки в одну, что значительно снижает время проведения исследований.

Кроме рассмотренных выше, известно большое число способов химической модификации аналитов, которые используются в ХТА при газохроматографическом исследовании. Например, при определении веществ из группы бензодиазепинов широко применяется *кислотный гидролиз*, в результате которого образуются обладающие хорошими хроматографическими свойствами бензофеноны; при исследовании в биологических объектах гидроксимасляной кислоты часто прибегают к переводу ее в γ-бутиролактон, который затем количественно определяют.

Дериватизация позволяет применять ГХ и для определения в биологических объектах ряда *металлов в виде их дитизонатов*, однако чаще для определения металлов используются другие методы (см. п. 5.4 и гл. 7).

В современном приборостроении очевидна тенденция к полной автоматизации всех этапов исследования, так что следует ожидать появления новых реактивов и оборудования для дериватизации.

Количественное определение

Хроматограмма представляет собой графическое изображение зависимости концентрации компонентов смеси в газе-носителе на выходе из колонки от времени. *Хроматографический пик*, соответствующий индивидуальному компоненту пробы, отражает изменение во времени концентрации этого компонента в газе-носителе на выходе из колонки и может быть охарактеризован рядом параметров: высотой пика (*h*); произведением высоты пика *h* на время удерживания *T* или пропорциональное ему расстояние на хроматограмме от момента ввода пробы до регистрации максимума пика; площадью пика (*A*) или величинами, приближенно характеризующими ее значение.

Установлено, что для хроматограммы, полученной в идеальных условиях, применение любого из указанных параметров для количественных определений должно давать одинаковые результаты. Поскольку реальные хроматограммы получают в условиях, далеких от идеальных, то в зависимости от конкретных условий анализа и применяемого оборудования ценность того или иного параметра пика может оказаться различной.

Критерии выбора параметра пика, на основании которого проводится количественное определение

* Простота и точность измерения параметра. Так, полная площадь пика в большинстве случаев является приемлемым параметром. Однако измерение площади на реальных хроматограммах обычно сопряжено с большими затратами труда и времени либо требует применения специального оборудования, стоимость которого соизмерима со стоимостью хроматографа. Поэтому такой параметр стараются заменить другим. * Линейность связи значения параметра с количеством соответствующего ему вещества (линейность параметра). Связь значения параметра с количеством компонента в пробе должна быть максимально близка к линейной, по крайней мере, в пределах изменения концентрации определяемого вещества в смесях, для которых методика предназначена. * Устойчивость параметра к изменению условий определения. Численное значение параметра пика определяется не только количеством вещества, которому этот пик соответствует, но и условиями определения, в которых он получен. Чем меньше влияют условия на параметры пика, тем надежнее результаты. При этом особенно важны те условия определения, которые влияют одновременно и на работу хроматографической колонки, и на работу детектора.

Высота хроматографического пика (h). На возможность использования высоты хроматографического пика для проведения количественного определения вещества влияют определенные факторы.

1. Флуктуации температуры колонки изменяют распределение концентрации вещества в газе-носителе, в результате чего может изменяться как абсолютное, так и относительное значение высоты пика при работе с любым детектором.

2. Флуктуации скорости потока газа-носителя, очевидно, не скажутся на абсолютных и относительных значениях высоты пика при работе с концентрационным детектором; при использовании потокового детектора будут меняться как абсолютные, так и относительные значения этого параметра.

3. Высота пика весьма чувствительна к перегрузке колонки; линейная связь между количеством введенной пробы и высотой пика нарушается, если вводимое количество пробы существенно больше допустимого для конкретной хроматографической системы; при использовании для количественного определения абсолютного значения высоты пика необходимо строго стабилизировать условия анализа.

Высота пика является наиболее *легко измеряемым* параметром, особенно при использовании приборов без устройств для обработки данных. Случайные ошибки, связанные с измерением на хроматограмме, как правило, минимальны.

Измерение высоты пика *рекомендуется использовать* в следующих случаях:

* при работе с хроматографом, обеспечивающим стабильность условий определения и высокую точность заданных температуры и скорости потока газа-носителя; * при определении сходных по составу проб и работе на непрерывно включенных приборах, например, на автоматических хроматографах, установленных в потоке или производственных лабораториях при круглосуточном режиме работы; в этом случае линейность параметра достаточно велика, поскольку пределы изменения содержания компонентов незначительны; * при выполнении экспрессных определений, когда имеется возможность повторить измерения, вызывающие сомнения; * если есть возможность точно дозировать пробу; * если легко выполнить и проверить калибровку прибора; * при расчете хроматограмм, содержащих плохо разделенные пики; * для приближенной оценки результатов.

Измерение высоты пика *не рекомендуется использовать* в следующих случаях:

* если калибровка прибора затруднена; * при использовании потокового детектора, если скорость потока газа-носителя задается и поддерживается недостаточно точно.

Следует иметь в виду, что изменение высоты пика составляет 0,3–0,9% при изменении температуры колонки на 1 °С, точность 2% при использовании метода абсолютной калибровки по высоте пиков может быть достигнута только при стабилизации температуры с точностью до 0,1 °С и скорости газа-носителя до 1 мл / мин, трудно получить результаты с относительной погрешностью менее 2,8–3,2% при концентрации компонента в пробе 1–2%, если в качестве параметра пика используется его высота.

Произведение высоты пика на время удерживания или расстояние, ему пропорциональное (hl). Флуктуации температуры и скорости потока газа-носителя воздействуют на этот параметр аналогично воздействию на высоту пика.

При использовании произведения *hl*, как и при любых количественных измерениях, требуется калибровка детектора по индивидуальным соединениям. Следует отметить, что по различным причинам эти калибровочные коэффициенты отличаются от коэффициентов, полученных при использовании площадей пиков.

Измерения, необходимые для вычисления произведения высоты пика на время удерживания, легко выполнимы и хорошо воспроизводятся.

Количественное определение на основе параметра *hl рекомендуется проводить* в следующих случаях:

* для расчета хроматограмм, в которых высота пика не искажена соседними пиками, в том числе хроматограмм с не полностью разделенными пиками; * при использовании детектора по теплопроводности или другого концентрационного детектора; * для расчета пиков с малой высотой (более точного, чем по высоте пика); * для расчета узких пиков, например, в капиллярной хроматографии; * для повторяющихся анализов, выполняемых нерегулярно.

Данный параметр *не рекомендуется использовать* в следующих случаях:

* если есть основания предполагать нелинейность изменения высоты пика вследствие перегрузки колонки или детектора в сочетании с потоковыми детекторами; * при анализе с программированием температуры; * при определении веществ с очень малым или очень большим временем удерживания; * при анализе смесей, дающих на хроматограмме пики, сильно различающиеся по высоте.

Расчеты без применения калибровочных коэффициентов при использовании этого параметра могут давать очень большие ошибки. Применение калибровочных коэффициентов, взятых из литературы для количественных расчетов, также приводит к ошибкам.

Площадь хроматографического пика. Влияние изменения условий хроматографического разделения на площадь пика сводится к следующему:

* флуктуации температуры не искажают площадь пика при работе с детекторами обоих типов; * флуктуации скорости потока газа-носителя при использовании концентрационных детекторов могут искажать как абсолютные,

так и относительные значения площади пика; * перегрузка колонки, если она не ухудшает разделения до недопустимых пределов, практически не влияет на площадь пика.

Площадь пика для детекторов, используемых в количественной хроматографии, является универсальным параметром, применимым во всех случаях, когда отсутствуют необратимые процессы в колонке и когда детектор работает в области нормальных рабочих условий. Применение потоковых детекторов при использовании площади пика предпочтительнее.

Методы количественного определения

В основу *способов*Правильно говорить не о методах, а о способах количественного определения методом ГЖХ, однако в специальной литературе способы часто называют методами количественного определения. Поэтому далее в тексте используется термин «метод». *количественного определения методом ГХ положены два допущения:*

* введенная в хроматограф проба имеет тот же состав, что и анализируемый раствор; * количество i-го компонента в пробе пропорционально высоте или площади пика этого компонента на хроматограмме.

Из этих двух допущений следует уравнение, связывающее концентрацию вещества *i* в анализируемом растворе *C~i~* с параметром его пика на хроматограмме *X~i~* и размером пробы *q~n~*:

$$C_i = \frac{k_i X_i}{q_n}.$$

Величину *k*~i~ называют абсолютным калибровочным коэффициентом. Физически эта величина означает количество компонента *i*, соответствующее единице параметра пика *X~i~*. Обычно *k~i~* — величина непостоянная, зависящая от условий хроматографирования и детектирования, а также абсолютного количества вещества *i*, поступающего в детектор. Если детектор работает линейно, *k~i~* не зависит от *q~n~* и при соблюдении постоянных условий хроматографирования и детектирования может считаться постоянной величиной для данного вещества.

Абсолютный калибровочный коэффициент обратно пропорционален чувствительности детектора, но, в отличие от нее, учитывает также конкретные особенности методики. Он имеет размерность, которая определяется используемыми единицами измерения параметра пика и количества вещества.

Задачей количественного анализа является определение концентрации анализируемого вещества в пробе. Непосредственно хроматографирование анализируемого раствора позволяет определить лишь значение параметра пика *X~i~*. Величину *k~i~* определяют путем хроматографирования растворов смеси с известным количеством вещества *i*.

Наибольшее применение на практике нашли метод абсолютной калибровки, метод стандартной добавки, метод внутреннего стандарта и метод нормировки. Методы количественного анализа различаются приемами, используемыми для нахождения количества вещества.

Метод абсолютной калибровки. При работе по методу абсолютной калибровки в хроматографическую колонку вводят известные количества вещества и рассчитывают площадь получаемых хроматографических пиков. По полученным данным строят график зависимости площади пика от количества вещества.

Недостатки метода:

* трудоемкость; * обязательное наличие чистых исследуемых соединений; * отсутствие учета влияния других компонентов, присутствующих в пробе, на параметры пика исследуемого соединения.

Метод стандартной добавки, позволяющий учесть влияние матрицы, заключается в том, что к анализируемой смеси добавляют различные известные количества того компонента (в чистом виде), содержание которого следует определить. По полученным данным строится график зависимости площади пика от количества добавки.

Содержание компонента в исходной анализируемой смеси соответствует площади, определяемой экстраполяцией на нулевую добавку.

Второй вариант этого метода — расчетный. Для получения результата измерения этим методом необходимо записать хроматограммы двух проб: исходной и исходной с добавлением известного количества определяемого компонента.

Обязательным условием для использования метода добавки является линейное изменение показаний детектора при изменении концентрации компонента в пробе за счет внесения добавки.

Метод внутреннего стандарта основан на том, что к анализируемой смеси добавляют определенное количество вещества, которое не входит в состав анализируемой смеси. Определяют отношение площадей пиков компонента и введенного стандарта и, используя предварительно полученную зависимость отношения площадей пиков от отношения весовых количеств этих компонентов в модельной смеси, определяют содержание анализируемого компонента.

Поправочный коэффициент, который определяется отношением площадей измеряемого вещества и стандарта, должен оставаться неизменным даже при изменении условий хроматографирования и детектирования, если, конечно, эти изменения не вызвали нарушения линейности работы детектора и в качестве параметра пика было использовано истинное значение площади.

Метод нормировки. В этом методе сумму площадей всех хроматографических пиков анализируемой смеси приравнивают к 100% и по величинам площадей отдельных компонентов определяют их процентное содержание в анализируемой смеси. Таким образом, этот метод позволяет установить лишь относительное содержание компонентов в разделяемой смеси. Кроме того, все компоненты смеси должны давать хроматографические пики. Наличие нехроматографируемых веществ приводит к серьезным ошибкам количественного определения.

Современное состояние и перспективы развития газовой хроматографии в ХТА

Метод ГХ постоянно развивается, появляются все новые направления его применения, растут селективность и чувствительность определения, появляются новые материалы, колонки и реактивы. В этом разделе рассматриваются только некоторые из перспективных направлений.

Быстрая капиллярная хроматография высокого разрешения. С появлением капиллярной хроматографии создалась ситуация, когда эффективность колонки в большинстве случаев настолько превосходит необходимый для решения конкретной аналитической задачи предел, что это приводит к неоправданному увеличению времени проведения исследований. Сократить его без потери эффективности проще всего двумя путями: уменьшением длины колонки и увеличением линейной скорости газа-носителя.

Ускорить анализ позволяют разработки последнего времени — поликапиллярные или многоканальные колонки, а также флеш-хроматография, при помощи которой на стандартных колонках удается осуществлять разделение веществ в 6–10 раз быстрее. Для этого применяется сверхбыстрая скорость нагрева колонки до 1200 °С за 1 мин.

Еще одним способом уменьшения времени анализа является использование сверхтонких колонок. Разрешающая способность колонки длиной 10 м и внутренним диаметром 0,1 мм равна разрешающей способности колонки длиной 25 м и внутренним диаметром 0,25 мм. Оптимальные условия разделения на короткой колонке позволяют проводить исследование сложных смесей в несколько раз быстрее. Такие колонки имеют преимущества в чувствительности при работе с потоковыми детекторами. Для достижения всех возможностей, предоставляемых ими, требуется современное оборудование с повышенной частотой сбора данных, эффективной печью, обеспечивающей скорость нагрева колонки до 100 °С за 1 мин, стабильным (расход газа должен быть воспроизводим) электронным расходомером газов, а также современным устройством для ввода образцов, позволяющим дозировать образцы при делениях потока 1 / 500 или 1 / 1000. Такими характеристиками обладают современные хроматографы ведущих отечественных и зарубежных приборостроительных фирм.

Системы фиксированного времени удерживания. Разработка таких систем стала возможна только после введения в практику капиллярной хроматографии оборудования с электронным пневматическим управлением расхода газа-

носителя, улучшенным контролем над температурой колонки, а также наличие колонок со стабильными свойствами, воспроизводимыми от партии к партии. Основываясь на этих достижениях, в настоящее время активно создаются системы, в которых удается так устанавливать и поддерживать рабочие характеристики оборудования, что ошибкой измерения времени удерживания как на каждом конкретном приборе, так и на разных, можно пренебречь. Другими словами, для идентификации веществ с помощью таких систем можно использовать абсолютное время удерживания вместо относительного. При этом и абсолютное, и относительно время будет одинаково на всех приборах с такими системами, как бы далеко они друг от друга ни располагались.

Каждая фирма-производитель современного хроматографического оборудования, используя свои подходы, предоставляет хроматографисту определенные возможности.

Использование системы фиксированного времени удерживания в том или ином виде чрезвычайно упрощает работу аналитика. Откалиброванное оборудование способно выявлять на ранних стадиях необратимые загрязнения колонки и потерю ее работоспособности. В большей степени этот метод важен при использовании комбинированных методов капиллярной хроматографии со спектральными методами, например ГХ-МС, ГХ-ИК-Фурье-спектрометрии и/или ГХ-УФ-спектрометрии многоколоночных приборов **(см. далее**).

Заключение

Простота контроля температуры, разнообразие комбинируемых детекторов, высокая эффективность и стабильность современных капиллярных колонок, воспроизводимость и переносимость данных при помощи нормализованного времени удерживания — все это обусловливает широту использования ГХ в аналитической токсикологии, особенно при анализе растворителей, летучих соединений и психоактивных веществ.

Основные сложности, связанные с использованием ГХ, — это потребность в квалифицированном персонале и соответствующей лабораторной инфраструктуре. Также для ГХ анализа необходимо проводить сложную пробоподготовку для образования летучих соединений и контролировать высокую температуру для поддержания летучего состояния аналитов. Главным преимуществом ЖХ перед ГХ является отсутствие необходимости в таких высоких температурах.

5.3.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Всё знают и всё понимают только
дураки и шарлатаны.

Антон Павлович Чехов (1860–1904),
выдающийся русский писатель,
драматург, врач,
общественный деятель

Умные люди на то и умные, чтобы
разбираться в запутанных вещах.

Михаил Афанасьевич Булгаков (1891–1940),
выдающийся русский и советский писатель,
драматург, тетральный режиссер, актер

ЖХ представляет собой хроматографический метод, в котором подвижной фазой является жидкость. Основные достоинства ЖХ заключаются в ее гибкости, относительно невысокой стоимости работы, широком выборе селективных детекторов и возможности автоматизации процесса. В совокупности эти свойства используются при совместном определении нескольких соединений, например лекарственного средства и его метаболита. ЖХ используется в фармакокинетических исследованиях, исследованиях метаболизма, терапевтическом лекарственном мониторинге и токсикологических исследованиях.

В ХТА используют следующие виды ЖХ: планарная (тонкослойная), бумажная и колоночная. Последняя дополнительно подразделяется по своим конструктивным особенностям на отрытые и замкнутые системы.

Под *отрытыми системами* чаще всего подразумевают стеклянные трубки или колонки, заполненные сорбентом с диаметром частиц более 30 мкм, через который самотеком или под действием пониженного давления после колонки пропускается жидкая фаза.

Закрытая система. Значительного увеличения эффективности добиваются уменьшением диаметра зерен неподвижной фаза до 10 мкм и менее. При этом возрастает сопротивление колонки, что требует подключения к оборудованию специальных насосов для формирования потока подвижной фазы. Описанная закрытая система дала название методу: *ЖХ высокого давления* или *ВЭЖХ.*

Преимущества ЖХ:

* быстрое эффективное разделение веществ, селективность контролируется составом подвижной фазы, или элюента; * возможность анализа высокомолекулярных соединений, недоступных ГХ; * чувствительные, селективные недеструктивные детекторы; * возможность проведения постколоночных реакций; * возможность совместной работы с масс-спектрометрическим детектором; * возможность ввода водных растворов; * низкая стоимость работы; * переносимое оборудование; * возможность автоматизации анализа.

Изначально ЖХ лекарственных и наркотических средств, ядов и их метаболитов проводилась в изократическом режиме элюирования, то есть при неизменном составе элюента. Однако при совместном определении разнополярных соединений или для уменьшения времени анализа используется градиентное элюирование. Для улучшения воспроизводимости времени удерживания и понижения вязкости элюента, что приводит к повышению эффективности разделения, ЖХ проводят при повышенной температуре. При этом надо иметь в виду, что при избыточной температуре велик риск изменить состав элюента и растворить наполнитель колонки.

При ЖХ возможны определенные сложности. Большое значение имеет каждый «элемент» анализа, от объема вводимой пробы и чувствительности детектора до возникновения интерференции. Осаждение компонентов пробы на колонке приводит к потере эффективности. При использовании реакционных детекторов, например МС, совместно элюируемые компоненты пробы могут значительно изменить сигнал аналита.

Несмотря на то что термическая стабильность определяемых веществ не имеет такого большого значения, как в ГХ, некоторые соединения, особенно метаболиты, нестабильны в самой биологической матрице и/или при воздействии pH в процессе пробоподготовки. Поэтому помимо выбора аналитической колонки и состава элюента при разработке методики необходимо учитывать сбор и хранение образцов, способ пробоподготовки и условия детектирования. В случае ЖХ-МС возможен распад аналита в источнике ионов, так что нужно обратить внимание на выбор подходящего внутреннего стандарта.

Главное функциональное различие между ГХ и ЖХ состоит в природе подвижной фазы, ведь жидкости не такие сжимаемые, как газы. Соответственно, наполнители колонок с меньшим размером частиц позволяют достичь большей эффективности при небольшой длине колонки и комнатной или около комнатной температуре. Также можно изменить состав подвижной фазы, чтобы улучшить время удерживания и селективность, что позволяет в большей степени контролировать процесс хроматографического разделения.

В отличие от ГХ в ВЭЖХ селективность метода определяется взаимодействием вещества не только с неподвижной фазой, но и в значительной степени с подвижной фазой. Кроме того, при сравнении этих методов необходимо учитывать, что ГХ используется для разделения и определения веществ, которые можно без значительных и воспроизводимых потерь перевести в парообразное состояние при температуре до 400 °С. Аналитические возможности ВЭЖХ ограничиваются растворимостью вещества в подвижной фазе. В связи с этим, по оценке некоторых ученых, только около 20% всех представляющих интерес проб можно анализировать методом ГХ. Однако в большинстве случаев эффективность ГХ на капиллярных колонках много выше эффективности ВЭЖХ. Таким образом, ГХ и ВЭЖХ дополняют друг друга и расширяют возможности ХТА.

Эффективность разделения в ЖХ, так же как и в газовой, оценивается уравнением Ван-Деемтера (см. выше). Коэффициенты диффузии веществ в жидкой фазе значительно ниже, чем в газовой, поэтому чем меньше коэффициент массопереноса (*С*), тем лучшими разделительными свойствами обладает колонка для ВЭЖХ. Низкие коэффициенты диффузии, кроме того, снижают по сравнению с ГХ значимость для эффективности разделения

коэффициента *B* того же уравнения, который уменьшается с увеличением линейной скорости потока подвижной фазы. Коэффициент *A* уравнения Ван-Деемтера зависит не от скорости подвижной фазы, а от размера частиц неподвижной фазы, который в ЖХ и особенно в ВЭЖХ имеет важное значение. Чем меньше эти размеры, тем меньше высота, эквивалентная теоретической тарелке, или больше число ТТ используемой колонки. Как раз затруднения в изготовлении малых частиц неподвижных фаз, обладающих воспроизводимыми свойствами, сдерживало развитие ВЭЖХ до середины 70-х годов XX в. Наименьшее из доступных в настоящее время зернение для сорбентов в ВЭЖХ имеют носители с диаметром зерен 1,5 мкм, а общепринятыми считаются сорбенты с зернами диаметром 3, 5, 7 и 10 мкм. Колонки с зернами менее 3 мкм обладают высоким сопротивлением потоку подвижной фазы и рядом других недостатков, однако все больше становятся популярными короткие колонки длиной до 2 см с зернами неподвижной фазы диаметром 1,5 мкм. Они обладают высокой эффективностью, малым временем анализа и очень малым расходом растворителей, составляющих подвижную фазу.

Аналитические колонки

Основным элементом любой элюирующей хроматографии является аналитическая колонка. Для поддержания колонки в хорошем рабочем состоянии ее необходимо использовать осторожно, чтобы сохранить целостность слоя колонки. Более высокая эффективность ЖХ обусловлена использованием наполняющего материала колонки с размером частиц от 1,8 до 5 мкм. Наполнитель колонки должен выдерживать высокий уровень создаваемого насосом противодавления, поэтому для этих целей обычно используют силикагель.

Для противостояния создаваемым давлениям системы наполнитель колонки упаковывается в трубки из нержавеющей стали, изнутри покрытые пористым керамическим материалом (размер пор варьируется от 0,5–2 мкм в зависимости от размера наполнителя). Колонки не должны использоваться с подвижной фазой, способной растворить наполнитель, и с пробами, содержащими твердые частицы. Важно подбирать смешиваемые друг с другом растворители, особенно если используемые растворители заменяются в процессе анализа или между анализами. Немодифицированные колонки с силикагелем заполняются гексаном, так как их обычно используют при нормально-фазовой хроматографии. Однако если планируется использовать такую колонку с подвижной фазой, содержащей метанол или водный раствор метанола, то перед использованием необходимо удалить гексан. Для этого колонку промывают трет-бутилметиловым эфиром или этилацетатом, которые смешивают с метанолом, а затем и только метанолом. Этилацетат можно заменить 2-пропанолом, благодаря чему можно не промывать колонку метанолом в конце, но он более вязкий, из-за чего создается повышенное противодавление.

Если в системе создается повышенное входное давление, то это чревато разрушением силикагельного наполнителя, образованием полостей и при использовании модифицированного силикагеля велик риск потерять модифицированный слой колонки, что приведет к потере селективности и/или эффективности. Образование полостей также возможно и при обычном рабочем давлении, если происходит резкая смена давления, и при ненадлежащем обращении, если колонку уронить. Образование полостей в наполнителе колонок приводит к появлению пиков неправильной формы и иногда к появлению двойных пиков.

На колонке указывается направление укладки наполнителя, поэтому поток подвижной фазы должен идти в том же направлении. В продаже можно найти такие аналитические колонки, которые можно использовать в двух направлениях, но для них необходимо время от времени менять направление потока для поддержания наполнителя в рабочем состоянии.

Предколонка – это небольшая колонка, которая устанавливается перед аналитической или препаративной колонкой, чтобы очистить поток элюента, содержащий пробу, от примесей, которые могут помешать анализу. Размер предколонки обычно составляет 5% размера аналитической колонки. Наполнитель предколонки должен быть таким же, как и у аналитической колонки. Для эффективной работы системы предколонку необходимо регулярно менять.

Внутренний диаметр колонки, связанный с величиной зерен сорбента, лежит в основе часто употребляемой в научной и методической литературе классификации типов колонок, которая приведена в табл. 5-10.

Таблица 5-10. Характеристики колонок для высокоэффективной жидкостной хроматографии

Типы колонок для ВЭЖХ	Внутренний диаметр колонки, мм	Типичная скорость подвижной фазы, мл / мин	Примечание
Препаративные	До 100	Более 5	Зернение носителя 10–50 мкм; длина может доходить до 600 мм
Обычные	3,9–5,0	1,5–5,0	Диаметр 4,6 мм наиболее оптимален с точки зрения скорости и эффективности разделения, а также емкости колонки
Узкие	2,1–3,9	0,5–1,5	–
Микроколонки (micro LC)	1,0–2,1	0,1–0,5	Низкий расход растворителей, высокая чувствительность, особенно при лимитированном количестве образца
Капиллярные	0,05–1,0	0,2–100	Обычно изготавливаются из нержавеющей стали с внутренним покрытием из стекла или плавленого силикагеля

Строение жидкостного хроматографа

Система для ЖХ состоит из емкостей с подвижными фазами, насоса высокого давления, контроллера потока, системы ввода проб, предколонки из нержавеющей стали, аналитической колонки, заполненной неподвижной фазой, детектора и устройства получения данных. Чаще всего используются следующие виды детекторов: УФ, детектор флуоресценции и МС.

Изократическое элюирование является простейшим режимом работы ЖХ, как и изотермическое хроматографирование у ГХ. При градиентном элюировании состав элюента (содержание органических растворителей, уровень pH и ионная сила раствора) изменяются по запрограммированной схеме посредством второго сосуда с растворителем, насоса и камеры смешивания. Также при помощи пропорционирующего клапана и камеры смешивания до четырех растворителей могут смешаны перед попаданием в единый насос.

Преимущества градиентного элюирования заключаются в том, что последующие элюируемые пики становятся более резкими, а время анализа сокращается. Подача элюента может быть запрограммирована для возврата к начальным условиям, но это может занять больше времени, чем охлаждение термостата ГХ. При градиентном элюировании с УФ детектором возможен дрейф базовой линии, но его можно свести к минимуму, если предварительно уравновесить поглощательную способность компонентов градиента при длине волны обнаружения. Основным преимуществом МС детектора является то, что дрейф базовой линии во время элюирования градиента обычно не существенен.

Выбор хроматографических систем

К настоящему времени разработано большое количество различных хроматографических материалов и элюентов, методов и оборудования для проведения анализа токсикантов, так что выбор конкретных условий достаточно прост.

Ниже перечислены общие правила выбора системы.

* Обращенно-фазовые системы обычно требуют контроля pH среды, органических растворителей, ионной силы раствора, ион-парных реактивов и др. Удерживание веществ на силикагелях менее предсказуемо. Они больше подходят для разделения разных по своим химическим свойствам веществ в отличие от обращеннофазовых сорбентов, которые более эффективны при разделении близких по свойствам веществ. * Основной проблемой при использовании нормальных фаз для анализа токсикантов в экстрактах биологических объектов является скапливание слабополярных веществ биологического происхождения в начале колонки или медленное их вымывание из колонки, сильно увеличивающее фон и снижающее эффективность системы. * Для обращенно-фазовой хроматографии соэкстрактивные вещества обычно элюируются либо раньше, либо вместе с анализируемым веществом, понижая чувствительность или вообще маскируя пик аналита. В этом случае хорошие

результаты может дать ион-парная хроматография. Среди обращенно-фазовых колонок наибольшее распространение в ХТА получили С-18-адсорбенты или их аналоги С-8.

ВЭЖХ в настоящее время относится к широко распространенным методам разделения с хорошими перспективами на дальнейшее расширение области его применения.

Особенности применения метода ВЭЖХ для определения различных токсикантов в биообъектах, а также некоторые экспертные методики, используемые в РФ, приведены в главах 6–10.

5.3.5. Капиллярный электрофорез

Все сказано на свете:
Несказанного нет.
Но вечно людям светит
Несказанного свет.

Новелла Николаевна Матвеева (1930–2016),
советская и российская поэтесса, прозаик, переводчик, бард,
драматург, лауреат Пушкинской премии в области поэзии (1998)

Проблемы при применении ВЭЖХ возникают тогда, когда необходимо быстро, с большой эффективностью проанализировать пробы, содержащие полярные и ионогенные вещества, особенно обладающие высокой основностью, а также биополимеры. Заряженные частицы перемещаются в растворе под влиянием электрического поля с различной скоростью, поэтому для разделения ионогенных соединений используют элекрофоретическую технику.

Сущность метода. Разделение пробы достигается приложением напряжения к буферным сосудам. Возникающее в капилляре электрическое поле вызывает миграцию зоны пробы. На электрофоретическое перемещение всегда накладывается более или менее интенсивный электроосмотический поток (ЭОП), который способствует пассивному транспорту зоны пробы, а не ее разделению. В большинстве буферов на поверхности кварцевого капилляра из-за диссоциации силанольных групп образуются отрицательные заряды. ЭОП возникает в основном из-за взаимодействия положительно заряженных ионов раствора с группами силанола и движется к катоду. ЭОП сильно зависит от значений pH буфера и свойств поверхности капилляра. ЭОП может быть настолько большим, что к катоду будут перемещаться не только нейтральные молекулы, но даже отрицательно заряженные ионы. Это обусловливает необходимость расположения детектора вблизи катодного пространства. Все незаряженные молекулы перемещаются с одинаковой скоростью, равной скорости ЭОП, и не могут быть разделены, а разделение ионов возможно благодаря их различной электрофоретической подвижности. Мешающие факторы (диффузионные, сорбционные, конвекционные, гравитационные и т. п.) в капилляре существенно ослаблены. Происходит весьма эффективное разделение смеси, так как *параметры электромиграции специфичны* для каждого вида заряженных частиц.

Скорость движения любого иона или смеси, несущей на себе общий заряд, в электрическом поле при заданном значении pH рассматривается как вектор суммы электрического потенциала и силы сопротивления. *Увеличивающееся напряжение и возрастающая при этом напряженность поля приводят к постоянному повышению скорости перемещения (скорости электрофореза) и вследствие этого к более высокой скорости разделения, которое зависит от разницы в подвижности частиц смеси.*

На электрофореграмме подвижность частиц (μ) разделяемой смеси рассчитывается исходя из времени движения частиц (*t*), длины аналитического сегмента капилляра (*l*) и приложенного напряжения (*V*):

$$\mu = \frac{\text{Скорость}}{\text{Градиент потенциалов}} = \frac{(l/t)}{(V/L)},$$

где *l* — длина до детекторного окна; *L* — общая длина капилляра.

Очевидная подвижность (μ~*app*~) — это сумма подвижности частиц смеси (μ~*a*~) и подвижности за счет ЭОП (μ~эоп~).

μ~*app*~ = μ~*a*~ + μ~эоп.~

При расчетах важно различать общую длину капилляра (*L*) и эффективную длину капилляра от места ввода пробы до детектора (*l*), так как электрическое поле уменьшается на протяжении общей длины капилляра, а молекулы мигрируют лишь в пределах эффективной длины капилляра. Поэтому данные о длине капилляров характеризуются отношением *l* / *L* в сантиметрах.

Эффективность разделения в методе *капиллярного электрофореза* (КЭ), выраженная как *N* (число теоретических тарелок), зависит от приложенного напряжения:

$$N = \mu_{app} \frac{V}{2D}.$$

Чем выше напряжение, тем быстрее происходит разделение и тем у́же пик. Высокое значение pH и, соответственно, высокое значение μ~эоп~ способствуют росту эффективности.

Часто КЭ рассматривают как дополнительный метод при определении многих аналитов, однако преимущества этого метода способствуют расширению его использования для решения задач ХТА (см. гл. 6–10).

Преимущества КЭ по сравнению с ГХ и ВЭЖХ:

* разделяемые вещества могут находиться в ионной и молекулярной формах, что затрудняет или делает невозможным использование ГХ; * по сравнению с ВЭЖХ отмечаются более высокие эффективность, разрешающая способность и скорость анализа (высокая разрешающая способность КЭ позволяет получить такое же количество пиков, как и при применении ВЭЖХ, но с меньшими затратами и за более короткий период); * для КЭ требуется существенно меньше растворителя по сравнению с ВЭЖХ, а капиллярная колонка для КЭ значительно дешевле, чем капиллярные колонки для ВЭЖХ или ГХ; * для КЭ требуется значительно меньшее количество пробы и реагентов, чем для ВЭЖХ; * при КЭ проще утилизировать лабораторные отходы.

КЭ является перспективным методом для технологий метаболомики и метабономики (см. гл. 2 и 5). Усовершенствование метода заключается в уменьшении размеров устройств (Lab-on-chip), и сегодня они уже коммерчески доступны для ряда лабораторий.

Недостатки КЭ:

* ограниченная чувствительность при УФ-детектировании (в 30–100 раз ниже, чем в ВЭЖХ); * затруднен сбор разделенных веществ из-за механических проблем и малого размера образцов.

Виды капиллярного электрофореза, используемые в ХТА

К настоящему времени значительное число различных классов токсикантов может быть проанализировано с помощью метода КЭ. Прежде всего это относится к лекарственным препаратам, наркотикам и пестицидам.

В ХТА используются различные виды КЭ:

* капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) и подтип КЗЭ — капиллярный ионный анализ; * мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ); * капиллярный изотахофорез в комбинации с МС; * капиллярный просеивающий электрофорез; * капиллярная электрохроматография; * электрохроматография.

В ХТА наиболее часто используют КЗЭ и МЭКХ.

В КЗЭ молекулы достигают детектора вместе с катионами и анионами и не могут быть разделены.

МЭКХ — относительно новый метод, сущность которого заключается в том, что формирующиеся заряженные микроэмульсии для образования гидрофобной псевдохроматографической фазы позволяют разделять и молекулы. К буферу добавляют детергент, и молекулы распределяются между буфером и мицеллами в соответствии с их гидрофобностью. Разделение связано с подвижностью мицелл, большинство из которых заряжено отрицательно. В основе разделения лежит процесс распределения, поэтому можно с полным основанием говорить о МЭКХ как о хроматографическом методе.

В МЭКХ полное разделение аналита достигается введением добавок детергентов, например циклодекстринов, к буферу. При этом образуются мицеллы, которые имеют гидрофобный характер внутри и заряжены снаружи, чем и достигается электрофоретическая подвижность в электрическом поле. В зависимости от знака заряда электрофоретическая подвижность направлена в сторону катода или анода. МЭКХ представляет собой одну из форм КЭ, которая делает возможным разделение не только анионов, катионов, молекул растворенных веществ, но и смеси энантиомеров. В КЭ оптически активная среда обычно создается добавлением оптически активного вещества (хирального селектора) к разделяющему буферу. Новые технологии — метаболомика и метабономика — широко используют МЭКХ для выявления различий метаболизма токсикантов у индивидуумов.

Выбор условий определения токсикантов

Схема устройства для проведения КЭ состоит из капилляра, детектора, источника высокого напряжения и записывающего устройства.

Введение проб. Воспроизводимое введение пробы представляет в КЭ наиболее сложную проблему. Объем вводимой пробы находится в пределах от 5 до 50 нл; больший объем пробы приводит к искажению пика и ухудшению разделения. Учитывая внутренний диаметр капилляра, необходимо устранить в пробе механические примеси и осадки. Как и в ВЭЖХ, пробы для анализа помещают в виалы обычно вместимостью 1,5 мл, которые закрепляют в специальном штативе. Электролитные растворы катода и анода обычно также помещаются в виалы (1,5 мл). В большинстве систем для КЭ стремятся сократить испарение образовавшегося пара, чтобы не изменить результаты при анализе малых объемов.

Используют преимущественно два способа введения проб.

* Гидродинамический способ. Введение пробы обеспечивается созданием разницы давлений между сосудом для пробы и концом капилляра, при этом давление либо повышается в сосуде для пробы, либо снижается на конце капилляра. Проблему при этом способе введения пробы составляет сжимаемость газа. Во-первых, выбранное для введения значение давления должно быстро достигаться, во-вторых, падение давления после введения пробы не должно быть резким. * Электрокинетический способ. При электрокинетическом введении сосуд с пробой, в который погружен капилляр, соединяется с источником напряжения и под действием короткого импульса тока компоненты пробы перемещаются в разделительный капилляр.

Компоненты пробы проходят через часть капилляра, в которой происходит детектирование в режиме реального времени, или детектируются на конце капилляра в режиме с разделением времени.

Узкие пики, характерные для КЭ, делают необходимым применение быстрых детекторов. Время ответа регулируется на большинстве детекторов и представляет собой отрезок времени, необходимый на определение пика. Узкие пики могут искажаться, если время ответа слишком протяженное, а очень узкие пики могут быть утеряны. Некоторые высокоподвижные анализируемые вещества могут давать пики неправильной формы, если используется низкий темп сбора данных, что может привести к неадекватным результатам количественного определения. Высокий темп сбора информации дает лучшее представление о форме пика.

Выбор схемы определения токсикантов в биологическом материале зависит от основных физико-химических параметров определяемых веществ. Например, вещества, составляющие пробу, лучше разделяются в буфере, pH которого лежит между значениями их p*Ka*.

В табл. 5-11 представлены схемы проведения КЭ.

Таблица 5-11. Схемы проведения капиллярного электрофореза: общие подходы (по D. Perrett, 2004)

Общая система	Состав буфера	Условия КЭ: pH	Метод	Напряжение, кВ	*t*, °C	Аналиты
A	25 ммоль натрия фосфата	2,8	КЗЭ	25–30	25	Водорастворимые, в основном пептиды
B	20 ммоль натрия тетрабората	9,2	КЗЭ	20–25	25	Водорастворимые составляющие кислотного характера
C	25 ммоль натрия тетрабората с 75 ммоль *SDS*	9,2	МЭКХ	15–25	20	Растворимые и малорастворимые в воде, заряженные и нейтральные аналиты, эндогенные составляющие
D	10 ммоль натрия тетрабората с 2 ммоль *TTAB* и 5 ммоль натрия хромата	9,0	КИА	25–30	20	Водорастворимые анионы
E	10 ммоль натрия тетрабората с 2 ммоль *TTAB* и 5 ммоль имидазола	9,0	КИА	25–30	25	Водорастворимые органические и неорганические катионы
F	25 ммоль натрия тетрабората с 75 ммоль *SDS* и 6,35 ммоль сульфат-β-циклодекстрина	9,2	МЭКХ, модифицированная циклодекстрином	18–22	25	Растворимые и малорастворимые в воде, заряженные и нейтральные аналиты, эндогенные составляющие
G	Метанол с ацетонитрилом (50:50)и аммония ацетатом (1 ммоль)		Неводный КЭ	20–30	25	Неполярные аналиты
H	Гептан (0,8%) + бутанол-1 (6,6%)с 3,3% *SDS* в 25 ммоль натрия тетрабората	9,2	МЭЭКХ	20	30	Заряженные и нейтральные аналиты, эндогенные составляющие

Примечание. *TTAB* — триметилтетрадецил аммоний бромид; *SDS* — натрия додецил сульфат; КИА — капиллярный ионный анализ; МЭЭКХ — микроэмульсионная электрокинетическая капиллярная хроматография.

Методы детектирования

Идентификация пиков в КЭ происходит так же, как в ВЭЖХ. Отличие заключается в том, что пробы движутся через детектор намного быстрее, а их количество и концентрация приблизительно в 10 раз меньше. Детектирование веществ происходит электрохимически, спектрально или с применением масс-спектрометра (табл. 5-12).

Стандартный детектор — это УФ-спектрофотометрический детектор. Детекция с помощью диодной матрицы позволяет записывать многоволновой спектр в режиме реального времени, в современных приборах часто используют масс-спектрометрический детектор (см. п. 5.3.6).

Таблица 5-12. Методы детектирования в капиллярном электрофорезе

Принцип детектирования	Предел обнаружения, моль / л	Токсиканты	Примечание

УФ-поглощение	10^–7^–10^–4^	Ароматические соединения, белки, нуклеиновые кислоты	Стандартное детектирование в КЭ, имеется во всех коммерческих приборах
Непрямое УФ-детектирование	10^–8^–10^–4^	Ионы металлов, амины, органические и неорганические ионы, углеводы	Имеется в коммерческих приборах
Флуоресценция	10^–9^–10^–4^	Аминокислоты, ДНК, пептиды, белки	Для большинства проб необходимо получение производных
Лазерная флуоресценция	10^–13^–10^–7^	Фрагменты ДНК, производные аминокислот	Лазер еще дорог. Детектор применим только в видимой и УФ-областях поглощения
Непрямая флуоресценция	10^–7^–10^–5^	Спирты, амины, анионы, катионы, углеводы	Редко используется
Амперометрия	10^–8^–10^–6^	Легко окисляемые и восстанавливаемые вещества, например нейромедиаторы	Используются капилляры с внутренним диаметром до 2 мкм
Кондуктометрия	10^–7^–10^–5^	Ионы металлов, аминов, карбоновых кислот	Трудности при замене капилляра
Потенциометрия	10^–8^	Ионы щелочных и щелочноземельных металлов	Определение за счет ионоселективных микроэлектродов
МС	10^–10^–10^–8^	Белки, пептиды, мониторинг лекарств, наркотиков	Отсутствуют проблемы совмещения, доступны коммерческие интерфейсы
Радиоактивные измерения	10^–15^–10^–13^	^32^P и ^14^C в биообъектах	Хорошая чувствительность определения с помощью системы остановки потока

Количественное определение

Количественное определение в КЭ проводятся на основании измерения на фореграммах высоты или площади пиков с применением метода абсолютной калибровки или с использованием различных вариантов метода внутреннего стандарта (см. выше). В этом КЭ мало отличается от других видов хроматографии. Обычно КЭ показывает более высокое разрешение по сравнению с ВЭЖХ. При определении наркотиков или лекарственных препаратов в биообъектах методом КЭ воспроизводимость результатов количественного определения составляет 5–15% и сравнима с воспроизводимостью результатов ВЭЖХ.

На воспроизводимость получаемых результатов влияет ряд факторов:

* различие в электропроводности разделительного электролита и раствора пробы; * различие в концентрации компонентов пробы; * различие в электрофоретической подвижности компонентов пробы; * различие в составе пробы.

Состав пробы во время ввода может измениться из-за занесения буфера в пробу или введения компонентов для селективного разделения (см. ниже).

Объем пробы при введении может изменяться за счет испарения. Этот эффект можно уменьшить охлаждением пробы или использованием герметичного затвора в сосуде для пробы.

При определении примесей количественное выражение их концентрации через высоту более надежно, чем через площадь пика, по двум причинам:

* при анализе примесей высота пика пропорциональна их концентрации, и эффекты насыщения и перегрузки можно исключить; * ошибка автоматизированного определения высоты в этом случае меньше, чем при расчете площадей пиков [как только высота пиков возрастает, интегрирование (расчет площадей) становится необходимым].

При оптимизации анализа необходимо находить компромисс между воспроизводимостью и эффективностью. Если требуется количественно проанализировать пробу, то для получения надежных результатов следует работать с концентрациями, превышающими предел обнаружения по крайней мере в 10–20 раз. Только при оптимальных условиях удается получить хорошую эффективность и высокую воспроизводимость площадей пиков в пределах от 1,5 до 3%.

Определение наркотиков и лекарственных средств

В разделении различных групп наркотиков и лекарственных средств используется ограниченное число электролитных систем для КЭ.

МЭКХ, особенно модифицированная добавлением сульфатированного β-циклодекстрина, часто применяется для анализа биологических жидкостей. При этом идентификация осуществляется аналогично используемым в хроматографии подходам. В КЭ основным параметром для идентификации является *электрофоретическая подвижность,* в отличие от ВЭЖХ и ГХ, где используются другие показатели, такие как время удерживания или объем удерживания.

Исследование хиральных наркотиков и лекарственных средств в биологических жидкостях. Для разделения энантиомеров применяют многие типы добавок к электролитам. Наиболее простой метод — это добавление к электролиту β-циклодекстрина, поскольку его конфигурация соответствует большому числу контролируемых веществ. Химически модифицированный циклодекстрин, особенно сульфатное производное β-циклодекстрина, позволяет разделить хиральные смеси со спектральным разрешением между энантиомерами. Для изучения биотрансформации энантиомеров наркотиков и лекарственных средств применяют КЭ.

Пример использования метода МЭКХ для определения наркотиков (по Е. А. Симонову и В. А. Калашникову, рис. 5-17, 5-18). Подобраны условия разделения стандартной смеси наркотиков, содержащей морфин, кодеин, героин, кокаин, амфетамин и метамфетамин. Разделение проводили в кварцевом капилляре с внутренним диаметром 50 мкм и длиной 64,5 см.

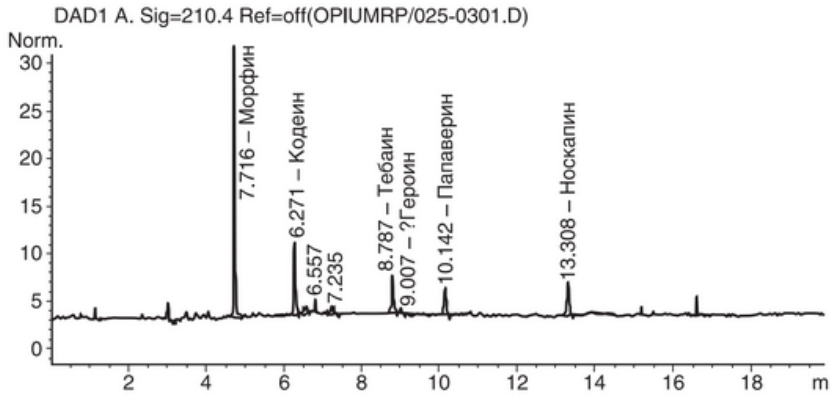


Рис 5-17. Фореграмма опия. Условия разделения: кварцевый капилляр с вну тренним диаметром 50 мкм и длиной 64,5 см. Для обнаружения и иденти фикации соединений применяли ультрафиолетовый детектор с диодной матрицей, позволяющей производить измерение поглощения и запись уль трафиолетового спектра без остановки разделения (пояснения в тексте)

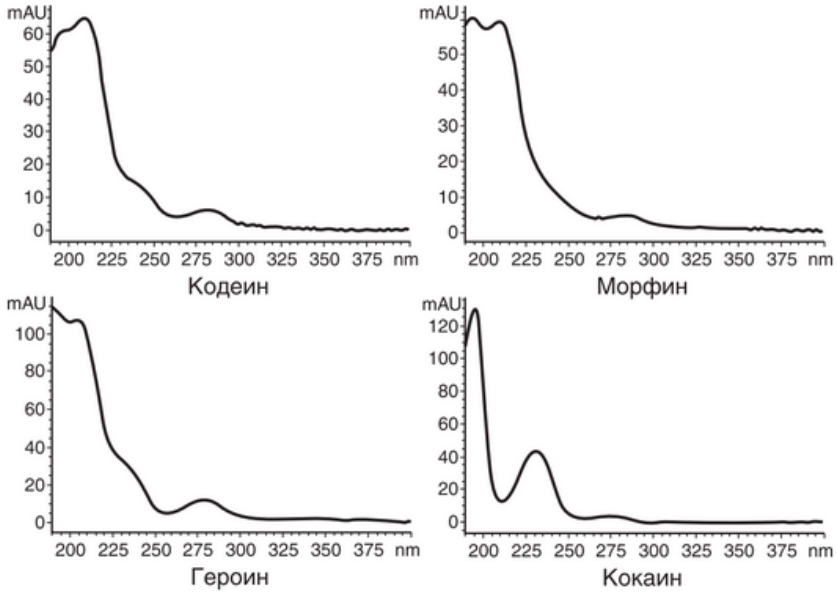


Рис. 5-18. Ультрафиолетовая детекция при разделении смеси наркотиков мето дом мицеллярной электрокинетической хроматографии (пояснения в тексте)

Для идентификации соединений применяли УФ-детектор с диодной матрицей, позволяющей производить измерение поглощения и запись УФ-спектра без остановки разделения. В качестве рабочего был использован буфер pH 9,5 следующего состава: 8,5 мМ боратного буфера; 8,5 мМ фосфатного буфера; 85 мМ додецилсульфата натрия; 15% ацетонитрила. Пробы вводили гидродинамическим способом в течение 10 с при давлении 50 мб. Температура разделения составляла 50 °С, напряжение 30 кВ. Запись электрофореграмм проводили при длине волны 210 нм. Перед каждым анализом промывали капилляр 0,1 н раствором NaOH, затем водой, буфером и кондиционировали при напряжении 30 кВ. Для проверки воспроизводимости времени миграции в течение 3 мес периодически проводили исследование тестовой смеси наркотиков в выбранных условиях. Время миграции наркотиков воспроизводимо для всех исследованных наркотиков. Например, для кодеина относительное стандартное отклонение времени миграции за этот период не превышало 0,5%.

Программное обеспечение прибора позволяет создавать собственные библиотеки спектров, по которым можно проводить сравнение получаемых в опыте результатов. В настоящее время создана и активно пополняется библиотека УФ-спектров наркотиков и других веществ, которые могут быть обнаружены, например, в образцах опия и героина. Количественное определение наркотиков проводили на основании калибровочных кривых по стандартным растворам, для построения которых использовали не менее 4–5 точек. Выбранные условия были использованы для исследования 12 образцов опия и героина, а также образцов амфетамина, метамфетамина и кокаина, полученных из различных источников. По электрофореграммам можно идентифицировать основные алкалоиды опия: морфин, кодеин, тебаин, папаверин и носкапин; при подобранных условиях они полностью разделяются и не мешают количественному определению. Проведенные исследования показывают перспективность использования КЭ для определения наркотиков.

Пример использования метода КЭЭ-МС в допинг-контроле при анализе образцов мочи на содержание оксибутирата (по С. А. Апполоновой и Н. В Архипенко). Пробоподготовка: аликвоту исследуемого образца мочи разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1:4. Для предотвращения лактонизации γ-оксимасляной кислоты добавляли 0,1 н раствор натрия гидроксида. pH полученного образца мочи контролировали по индикаторной бумаге со шкалой (pH среды 13,0–14,0). Предел детектирования — 0,5 мкг / мл. Основные параметры определения методом КЭЭ-МС представлены в табл. 5-13.

Таблица 5-13. Параметры определения оксибутирата методом КЭЭ-МС*

Система КЭФ	
Капилляр	Кварцевый капилляр Beckman, длина 100 см, диаметр 50 мкм
Буфер	10 мМ ацетат аммония
pH	14,0

Приложенное напряжение	25 кВ
Термостатирование	25 °С
Результирующий ток	40 мкА
Инжектор	Пробу вводили под давлением 0,5 psi / 5 с (1 psi = 6894,76 Па)
Масс-спектрометр	
Способ ионизации	Электрораспыление
Режим регистрации	Регистрация отрицательных ионов
Температура капилляра	325 °С
Температура распыляющего газа	250 °С
Скорость потока распыляющего газа	3 л / мин
Напряжение на капилляре	3500 В
Количество ионов при заданном времени накопления	30 000
Максимальное время изоляции ионов	300 мс
Диапазон сканирования	50–108 *m / z*
Напряжение на умножителе	1930 В

* Воспроизводимость метода зависит от электропроводности мочи.

Таким образом, КЭ позволяет:

* достигать высокой эффективности разделения с числом теоретических тарелок более 10^5 ^при хорошей массовой чувствительности до 10−^18^–10−^20^ моль; * реализовать множество режимов разделения с различной селективностью на одном оборудовании; * использовать малые объемы образца (несколько нанолитров).

Малый расход растворителей и низкая стоимость других расходных материалов, возможность соединения с различными детекторами, простота оборудования свидетельствуют о том, что в самое ближайшее время этот метод будет широко использоваться для решения задач ХТА.

В России налажен серийный выпуск системы капиллярного электрофореза «Капель» (первого отечественного семейства приборов, предназначенных для реализации этого метода) для количественного и качественного определения состава проб веществ в водных и водно-органических растворах. На приборах любой из модификаций системы «Капель» могут быть реализованы методики, относящиеся как к варианту КЗЭ, позволяющего анализировать только ионные компоненты пробы, так и к режиму МЭКХ, предназначенной для анализа ионных и молекулярных форм веществ.

Особенности применения КЭ для определения различных токсикантов в биообъектах, а также экспертные методики, используемые в РФ, приведены в гл. 6–10.

Новые технологии — метаболомика и метабономика — широко используют МЭКХ и КЭ-МС для выявления различий метаболизма токсикантов у индивидуумов.

5.3.6. Хроматографические методы с масс-спектрометрическим детектированием

Что такое истина?
Соответствие наших суждений явлениям.

Дени Дидро (1713–1784), французский писатель,
философ-просветитель, основавший «Энциклопедию,
или Толковый словарь наук, искусств и ремесел»,
почетный член Петербургской АН

Вдвойне дает тот, кто дает быстро.

Луций Анней Сенека Старший (54 г. до н.э. – 39 г. н.э.),
древнеримский писатель, философ

Основные понятия и определения

«Масс-спектрометрия — это искусство измерения атомов и молекул с целью определения их молекулярного веса. Такая информация о массе или весе иногда достаточна, часто необходима, но всегда полезна для идентификации вещества. На практике такое искусство заключается в размещении заряда на молекуле анализируемого вещества и дальнейшем наблюдении за траекториями движения получаемых при этом ионов в вакууме под воздействием различных комбинаций электрических и магнитных полей. Суть данного метода заключается в превращении нейтральной анализируемой молекулы в ионы. Для небольших и простых аналитов такая ионизация может быть осуществлена в газовой фазе при взаимодействии их с электронами, фотонами или другими ионами. В последние годы усилия исследователей были направлены на разработку новых технологий для получения ионов настолько сложных и комплексных веществ, что попытка их испарения и перевода в газовую фазу обычно приводит к частичному или значительному, а иногда и к полному распаду исследуемой структуры», — слова лауреата Нобелевской премии по химии 2002 г. Д. Б. Фенна (J. B. Fenn).

Метод МС в сочетании с хроматографическими методами позволяет идентифицировать неизвестные вещества и проводить их количественное определение в широком диапазоне концентраций. Это арбитражный метод в ХТА, который считается «золотым стандартом».

Существенное отличие МС от других аналитических спектральных методов, например оптических, состоит в том, что оптические методы детектируют излучение или поглощение энергии молекулами или атомами, а МС — непосредственно сами частицы вещества.

Масс-спектрометр — это прибор, осуществляющий измерение отношения массы фрагмента молекулы к его заряду. Попадая в масс-спектрометр, анализируемые молекулы последовательно ионизируются, получившиеся в результате этого ионы разделяются в зависимости от присущих им отношений массы к заряду и детектируются. Результатом этих процессов является МС, который несет в себе информацию о молекулярной массе аналита и его структуре.

МС — совокупность данных об образующихся при определенных условиях ионизации в результате распада конкретного вещества ионах и их интенсивности.

Характеристический ион — обычно молекулярный ион или его фрагмент, присутствие которого в МС способствует идентификации вещества.

Относительная интенсивность — интенсивность ионов в МС, которая выражается в процентах к интенсивности максимального иона в данном спектре (иногда она опускается).

Масс-спектрометры любого вида обычно работают *в двух режимах регистрации* ионов:

* сканирования (SCAN) полного или части диапазона величин отношения массы к заряду исследуемого вещества; * мониторинга характеристических ионов (селективный ионный мониторинг, SIM) вещества в пределах определенного заданного времени (dwell times).

Отношение сигнал / шум — характеристика метода, которая является отношением величины сигнала детектора к интенсивности систематических и других помех, вызванных разными причинами. Обычно соотношение 3:1 считается значимым с точки зрения регистрации сигнала анализируемого вещества.

Динамический диапазон (в МС), или диапазон линейности. Когда анализируют смесь, содержащую 99,99% одного соединения или какого-либо элемента и 0,01% какой-либо примеси, то должна быть увереннность, что правильно определяют и то и другое. Современные масс-спектрометры при определении вещества органической природы имеют динамический диапазон в 5–6 порядков, а масс-спектрометры, предназначенные для элементного

анализа, — в 9–10 порядков. Динамический диапазон в 10 порядков означает, что примесь в пробе будет определена даже при условии, что она составляет 10 мг на 10 т.

Разрешение (разрешающая способность) МС — количественная характеристика способности анализатора разделять ионы с соседними массами или, иначе говоря, определять точную массу иона. Для магнитных масс-анализаторов расстояние между пиками МС не зависит от массы ионов и разрешение представляет собой величину, равную $M / \Delta M$. Эта величина, как правило, определяется по 10% высоте пика. Например, разрешение 1000 означает, что пики с массами 100,0 и 100,1 атомных единиц массы (а. е. м.) отделяются друг от друга, т. е. не накладываются вплоть до 10% высоты.

Для анализаторов, у которых расстояние между пиками меняется в рабочем диапазоне масс (чем больше масса, тем меньше расстояние), таких как квадрупольные анализаторы, ионные ловушки, времяпролетные анализаторы, строго говоря, разрешение имеет другой смысл. Разрешение, определяемое как $M / \Delta M$, в данном случае характеризует конкретную массу. Эти масс-анализаторы принято оценивать по *ширине пиков* — величине, остающейся постоянной во всем диапазоне масс. Она обычно измеряется на 50% их высоты. Для таких приборов ширина пика, на полувысоте равная единице, является неплохим показателем и означает, что такой масс-анализатор способен различить номинальные массы, отличающиеся на единицу практически во всем его рабочем диапазоне (см. ниже).

Номинальной массой или массовым числом называют ближайшее к точной массе иона целое число в шкале атомных единиц массы. Например, масса иона водорода H^+^ равна 1,00787 а. е. м., а его массовое число — 1 или 1 Д. Масс-анализаторы, которые в основном измеряют номинальные массы, называют анализаторами низкого разрешения. Ионные ловушки (см. ниже) в узком диапазоне масс могут работать как масс-спектрометры высокого разрешения, обеспечивая как минимум разделение пиков, отстоящих на 1 / 4 а. е. м. друг от друга. Приборы среднего или высокого разрешения — масс-спектрометры с двойной фокусировкой (магнитной и электростатической) ионно-циклотронного резонанса. Разрешение в несколько тысяч можно получить при использовании времяпролетных масс-анализаторов (см. ниже).

Точность измерения массы — другая важная характеристика метода, связанная с разрешением. Измерение масс заряженных частиц позволяет определять брутто-формулу исследуемого вещества. Это возможно благодаря тому, что атомные массы элементов и их изотопов не являются целочисленными величинами, при этом установлено, что в природе соотношение изотопов одного и того же элемента обычно неизменно. В табл. 5-14 приведены точные массы стабильных изотопов легких элементов.

Таблица 5-14. Точные массы стабильных изотопов легких элементов

Элемент	Изотоп	Точная масса	Частота встречаемости в природе
Водород	H	1,007825	99,985
	D	2,01410	0,015
Углерод	^12^C	12,0000	98,9
	^13^C	13,00335	1,1
Азот	^14^N	14,00307	99,63
	^15^N	15,00011	0,37
Кислород	^16^O	15,99491	99,76
	^17^O	16,99913	0,04
	^18^O	17,99916	0,20

Основываясь на данных табл. 5-14 для иона с номинальной массой 28 Д можно подобрать следующие формулы:

CO		N~2~		CH~2~N^+^		C~2~H~4~	
^12^C	12,0000	^14^N~2~	28,0062	^12^C	12,0000	^12^C~2~	24,0000
^16^O	15,99491			^1^H~2~	2,0156	^1^H~4~	4,0312

27,99491	^14^N	14,00307	28,0312
		28,01867	

Молекулярные ионы будут регистрироваться масс-спектрометром порознь при разрешении 2500, а точное значение массы даст ответ, какой из газов регистрируется. Измерение точной массы доступно на приборах с двойной фокусировкой или на тандемном квадрупольном масс-спектрометре (см. ниже). МС помогает установить молекулярную формулу анализируемого вещества с достаточно высокой степенью надежности. Более того, при переходе к сложным молекулам установление изотопного состава вещества позволяет решать ряд серьезных аналитических задач, например установление региона производства различных наркотиков или определение потребления синтетических допингов (см. гл. 6 и 8).

История развития МС насчитывает более 100 лет.

Устройство масс-спектрометра

Основные компоненты масс-спектрометра — это входное устройство (источник ионов) и система выбора ионов (масс-анализатор), каждый из которых находится в условиях вакуума, детектор (обычно умножитель электронов), система получения и обработки данных. Введение пробы в источник наиболее эффективно достигается при помощи хроматографических или электрофоретических методов, так как это позволяет перевести аналит в газовую фазу при низкой скорости потока подвижной фазы.

Источник ионов испускает ионы через фокусирующую щель. Кинетическая энергия частиц, проходящих через электрическое поле, придает им инерцию, которая определяется их массой. Таким образом, чем меньше частица, чем больше ее заряд, тем быстрее она движется. Масс-анализатор либо направляет частицы с необходимым m/z в детектор при помощи изменения электрического и/или магнитного поля, либо измеряет время пролета частицы в зависимости от настройки. Он может как определять узкий диапазон значений m/z, так и сканировать все присутствующие ионы в заданном пределе.

Силу масс-спектрометра можно увеличить многократно при помощи последовательного объединения нескольких масс-анализаторов. В некоторых приборах встречается последовательная комбинация нескольких квадрупольных анализаторов, например, трех в тройном квадрупольном масс-спектрометре (triple quad). В таком масс-спектрометре молекулярный ион образуется посредством химической ионизации. Первый квадруполь (Q1) ускоряет ионы с определенным m/z и направляет их на второй анализатор (Q2, или ячейка соударения), где ионы фрагментируются, соударяясь с молекулами газа ячейки (гелий, азот или аргон). Проходящий через Q1 ион называется ионом-прекурсором или родительским ионом. Образующиеся в результате фрагментации ионы называются ионами-продуктами или дочерними ионами. Третий квадруполь (Q3) сканирует дочерние ионы или избирательно пропускает нужные ионы в детектор. Фрагментация определяется природой газа, который заполняет ячейку соударения, энергией ускорения ионов на Q1, а также температурой и давлением в ячейке соударения. Также в МС используется другой анализатор – ионная ловушка.

Масс-спектрометр с тройным квадруполем обладает широким применением за счет изменения режимов работы квадруполей. Например, режим Product Scan применяется для исследования структуры, поиска неизвестного соединения, подтверждения спектров, а режим Precursor Scan — для поиска аналитов с похожей структурой, которые образуют один дочерний ион, другие режимы.

Оборудование для проведения исследований методом масс-спектрометрии

Оборудование для проведения исследований методом МС обычно состоит из нескольких основных блоков. На рис. 5-19 приведена принципиальная блок-схема масс-спектрометра.

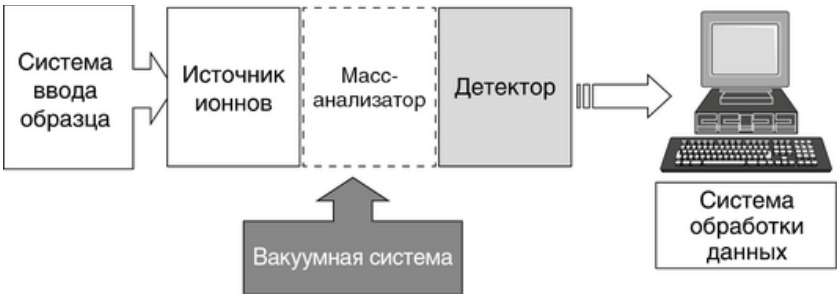


Рис. 5-19. Принципиальная блок-схема масс-спектрометра

Системы ввода образцов

Системы ввода образцов были одним из первых этапов в разработке масс-спектрального оборудования, что обусловлено необходимостью введения образцов, находящихся в условиях нормального атмосферного давления (760 торр, или мм рт. ст.) в прибор, анализирующие части которого функционируют в условиях вакуума около 10^–6^ торр, причем в момент введения нежелательны скачки давления в ту или иную сторону.

К настоящему моменту разработано несколько подходов к решению этой проблемы, которые рассматриваются ниже.

Прямой ввод веществ в камеру ионизации используется, если образец не может быть проанализирован хроматографическими методами. В этом случае в зависимости от агрегатного состояния образца применяют простейший метод введения газообразных или жидких образцов в источник ионов через мембранный фильтр. Иногда предусмотрено нагревание образцов до 100–150 °С. Приборы с такой системой ввода, отличающиеся компактностью и простотой, широко используют в нефтегазовой и химической промышленности, а также для мониторинга опасных веществ (обычно с молекулярной массой до 300 Д) в окружающей среде, в том числе для исследований во внелабораторных условиях.

Классическим вариантом прямого ввода веществ в камеру ионизации является использование *вакуумного штока с контролируемой температурой*, на конце которого располагается виала (DIP — Direct Insertion Probe) или *катод с нанесенным на него образцом* (DEP — Direct Exposure Probe), которые широко применяют для введения жидких и твердых образцов. Проба, помещенная в короткие капилляры или металлические стаканы, через вакуумный замок продавливается в ионизационную камеру масс-спектрометра, где происходит ее возгонка под действием вакуума и повышенной температуры, намного большей, чем при рассматриваемом ранее прямом введении парообразных веществ. При таком введении к чистоте образца предъявляются повышенные требования. Далее приведены особенности каждого из этих подходов.

Прямой ввод (DIP)	**Прямое испарение (DEP)**
Образец находится в микровиале	Образец нанесен непосредственно на катод нагревателя
Нагревание по температурной программе (до 400 °С, максимальная скорость нагревания до 200 °С / мин)	Баллистическое нагревание для ускорения испарения
Анализ твердых проб широкого профиля	Анализ высококипящих соединений

Для решения ряда задач ХТА и криминалистического исследования наркотиков, лекарств и других объектов наиболее эффективно использовать прямой ввод, и современное оборудование позволяет это сделать. Особенно полезной оказалась возможность использования масс-спектрометра в режиме тандемной МС. Некоторые ведущие приборостроительные фирмы выпускают собственные модификации устройств для прямого введения образцов. Например, устройство Chromatoprobe фирмы «Вариан» (США) разработано на базе хроматографического инжектора для газового хроматографа этой фирмы, оно оптимально подходит для термически стойких соединений и позволяет вводить образец в масс-спектрометр без нарушения вакуума. Образец помещается в микровиалу, импульсно нагреваемую в зоне инжектора. После испарения проба по короткому переходнику поступает в масс-спектрометр и анализируется в режиме электронного удара или химической ионизации (см. ниже). Преимуществами этой схемы являются отсутствие риска возникновения вакуумной течи при постоянном вводе и выводе штоков DIP

и DEP, а также существенно меньшее загрязнение масс-анализатора компонентами образца (типичная ситуация при испарении пробы в области источника ионов). Например, при работе с устройством Chromatoprobe определяли ЛСД и его метаболиты (см. гл. 6) в волосах наркоманов практически без пробоподготовки и за короткий промежуток времени (до 10 мин).

Для введения в источник ионов термолабильных веществ, разделение которых методом ГХ невозможно, применяется *ЖХ.* При этом подходе ионизация исследуемых веществ осуществляется мобильной фазой. В настоящее время в практику многих лабораторий мира вошли специальные устройства между жидкостным хроматографом и масс-спектрометром — *интерфейсы:* электроспрей (ESI), химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI), фотоионизация при атмосферном давлении, способы функционирования, возможности и недостатки которых будут рассмотрены далее.

Наиболее распространенная в настоящее время техника введения образцов в масс-спектрометр — *ГХ.* Один конец капиллярной колонки вводится непосредственно в источник ионов, куда попадают газ-носитель, исследуемое вещество и некоторое количество загрязнителей (стационарная фаза, масло). При использовании колонок большего диаметра применяют различные модификации делителей и сплиттеров для уменьшения потока газа-носителя. Избыток газа-носителя удаляется из спектрометра с помощью насосов вакуумной системы.

Прямая ионизация объекта предназначена для исследования высокомолекулярных веществ с применением экзотических методов ионизации: бомбардировки быстрыми атомами, ионизации коронарным разрядом и т.д. (в ХТА практически не используется.).

Методы ионизации

Ионизация — процесс, происходящий в ионизационной камере и приводящий к образованию ионов анализируемого вещества. Под методом ионизации понимается механизм ионизации и в то же время источник ионизации — устройство, внутри которого она осуществляется.

Все методы ионизации, применяемые в МС, обычно можно разделить на группы (табл. 5-15):

* протонирование; * депротонирование (депротонация); * катионизация; * перенос заряженных частиц из жидкой фазы в газовую; * захват или потеря электронов и др.

Таблица 5-15. Преимущества и недостатки различных методов ионизации

Метод ионизации	Преимущества	Недостатки
Протонирование, образуются положительно заряженные ионы	Многие вещества могут принимать протоны и ионизироваться. Проводится с помощью ESI, APCI, MALDI, FAB, CI (см. табл. 5–17)	Многие вещества нестабильны при протонировании, например углеводы, или не могут принимать протоны, например углеводороды
Катионизация, образуются положительно заряженные ионы	Многие вещества способны взаимодействовать с катионами Na^+^ или K^+^ и ионизироваться. Проводится с помощью ESI, APCI, FAB, MALDI	Фрагментация затруднена или вообще не осуществляется при работе в тамдемной МС
Депротонирование (депротонация), образуются отрицательно заряженные ионы	Наиболее подходит для исследования веществ кислотного характера. Проводится с помощью ESI, APCI, FAB, MALDI.	Фрагментация очень специфична и чувствительна к структуре вещества
Перенос заряженной молекулы в газовую фазу, образуются положительно и отрицательно заряженные ионы	Подходит только для веществ, которые в растворе уже находятся в ионизированной форме. Проводится с помощью ESI, APCI, FAB, MALDI	Неионизированные в растворе вещества не определяются

Электронный удар, образуются положительно заряженные ионы	Наблюдается при ионизации электронами и может предоставить информацию о молекулярной массе и фрагментации анализируемой молекулы	Часто получаемая фрагментация слишком избыточна. Имеются трудности в определении молекулярного иона, что создает проблемы в идентификации и интерпретации полученных результатов
Электронный захват, образуются отрицательно заряженные ионы	Наблюдается при ионизации электронами и может предоставить информацию о молекулярной массе и фрагментации анализируемой молекулы	Часто получаемая фрагментация слишком избыточна. Имеются трудности в определении молекулярного иона, что создает проблемы в идентификации и интерпретации полученных результатов

Протонирование — метод ионизации, при котором к анализируемой молекуле присоединяется протон или несколько протонов, сообщая молекуле каждый раз заряд +1. Перераспределение электронной плотности молекулы приводит к образованию стабильных катионов. Таким способом часто ионизируют пептиды. Этот вид ионизации характерен для MALDI, ESI и химической ионизации при атмосферном давлении (APCI).

Депротонирование *(депротонация)* — метод ионизации, при котором от молекулы отщепляется протон, в результате чего молекула приобретает заряд –1. Этот вид ионизации характерен для MALDI, ESI и APCI при исследовании веществ кислотного характера, например фенолов, карбоновых и сульфоновых кислот и др.

Катионизация — метод ионизации, при котором положительно заряженные частицы образуются при взаимодействии с катионами щелочных металлов или алюминия. Этот вид ионизации оказался полезен для нестабильных при протонировании молекул и может быть реализован с применением MALDI, ESI и APCI.

Перенос заряженных веществ в газовую фазу обычно осуществляется путем десорбции или распыления жидкости в газ. Этот вид ионизации достаточно просто может быть реализован с применением MALDI и ESI.

Электронный удар — метод ионизации, при котором осуществляется бомбардировка молекул анализируемых веществ пучком электронов определенной энергии. При этом молекула теряет электрон и получает заряд +1, который быстро перераспределяется, образуя радикалы и катионы. Этот вид ионизации наиболее подходит для относительно неполярных низкомолекулярных веществ, при этом обычно хорошо видна фрагментация исследуемой молекулы.

Захват электронов — метод ионизации, при котором абсорбция или захват электронов приводит к ионизации молекулы, обладающей высоким сродством к электрону, например молекул полиненасыщенных углеводородов, галогенсодержащих или металлорганических веществ.

Источники ионизации

Только четверть века назад исследователи в области фармакологии, биохимии, токсикологии и судебной медицины начали использовать в своей работе масс-спектрометрическое оборудование. Его возможности были ограничены исследованием относительно низкомолекулярных веществ в газовой фазе, ионизация которых происходила при помощи электронного удара. Однако сейчас ситуация значительно изменилась: недаром мировое научное сообщество присудило много самых престижных премий разработчикам, добившимся успехов в создании новых подходов к масс-спектральным исследованиям.

Весьма справедливы слова советского академика Л. Ландау: «величайшим достижением человеческого гения является то, что человек может понять вещи, которые он уже не может вообразить».

В табл. 5-16 приведены источники ионизации, которые уже используются в ХТА и те, возможное применение которых в ближайшее время прогнозируется.

Таблица 5-16. Источники ионизации и принципиальные схемы их функционирования

Источник ионизации	Условное сокращение	Схема функционирования
Электроспрей	**ESI**	Выпаривание заряженных капель
Наноэлектроспрей	**nanoESI**	Выпаривание заряженных капель
Химическая ионизация при атмосферном давлении	**APCI**	Коронарный разряд и перенос протонов
Ионизация лазерной десорбцией при содействии матрицы	**MALDI**	Абсорбция фотонов и перенос протонов
Фотоионизация при атмосферном давлении	**APPI**	Абсорбция фотонов и перенос протонов
Бомбардировка быстрыми атомами	**FAB**	Десорбция ионов и перенос протонов
Электронный удар	**EI**	Электронный пучок и перенос электронов
Химическая ионизация	**CI**	Перенос протонов

Масс-анализаторы

После проведения ионизации образца одним из описанных выше методов сумма образовавшихся ионов попадает в масс-анализатор. За период существования МС разработано несколько видов таких анализаторов. Каждый из них имеет свои преимущества, недостатки, а также свою стоимость, порой немалую. При выборе прибора необходимо четко представлять круг задач, которые планируется решать с его помощью, и насколько точны и адекватны поставленным задачам будут получаемые с их помощью результаты.

В основе *качественных характеристик* любого масс-анализатора лежат:

* быстродействие; * точность определения массы; * диапазон измеряемых масс; * разрешающая способность; * скорость сканирования; * возможность проведения многократного сканирования масс (МС-МС).

В ХТА чаще всего используются:

* магнитные секторные анализаторы; * квадрупольные анализаторы с квадрупольным фильтром; * квадрупольные анализаторы с квадрупольным фильтром — ионные ловушки.

В этом разделе представлены и некоторые новые анализаторы, появившиеся в последнее время.

Какой бы конструкции ни был масс-анализатор, какой бы механизм ионизации ни применялся, всегда нужно помнить о том, что масс-спектрометры измеряют не массу, а величину *отношения массы иона к его заряду*. Этот факт часто приводит к серьезным затруднениям в интерпретации полученных результатов. Например, ион (C~37~H~38~N~16~O~14~)^2+^ имеет молекулярную массу 976,5 Д и отношение массы к заряду 488,3.

Получение многозарядных ионов характерно для ВЭЖХ или КЭ и ионизационных методов, разработанных для них, например ESI. Для ГХ больше характерно образование однозарядных ионов.

Точность масс-анализатора определяется стабильностью и разрешающей способностью прибора. Например, при заявленной точности 0,01% прибор надежно определяет молекулярную массу пептида 1000 Д с ошибкой ±0,1 Д или для пептида с молекулярной массой 10 000 Д с ошибкой ±1,0 Д.

Диапазон масс масс-анализатора — один из основных параметров прибора. Например, для квадрупольного фильтра типичный диапазон составляет 3000 *m / z*, для магнитного секторного прибора — до 10 000 *m / z*, а у времяпролетного диапазон практически не лимитируется.

Возможность МС-МС-анализа — это возможность масс-анализатора проводить многократное циклическое исследование выбранных ионов. Например, проводится исследование вещества, выбирается его

характеристический ион, фрагментация которого исследуется, затем снова выбирается характеристический ион и исследуется его фрагментация с целью выбора нового характеристического иона и т.д. Под этим процессом подразумевается тандемная МС, или МСn. Указанной способностью обладают лишь некоторые масс-анализаторы. Их характеристики будут рассмотрены ниже.

Скорость сканирования — важнейшая характеристика масс-анализатора. Многие из них обладают низкой скоростью, для сканирования полного диапазона требуется несколько секунд. Здесь необходимо отметить, что типичная ширина хроматографического пика в капиллярной хроматографии составляет 2 с. С другой стороны, времяпролетный анализатор способен провести полную развертку по всему диапазону измеряемых масс за несколько миллисекунд и даже меньше.

Основные характеристики масс-анализаторов:

* магнитный секторный масс-спектрометр; * квадрупольные анализаторы; * квадрупольный анализатор ионная ловушка; * времяпролетный анализатор (ToF); * электростатическая ионная ловушка (LTQ Orbitrap).

Основные типы масс-детекторов

Детектирование ионов является еще одним ключевым моментом успеха масс-спектрометрического исследования. Выбор соответствующего устройства для детектирования зависит от ряда условий и, главным образом, от поставленной аналитической задачи.

Вакуумные системы в масс-спектрометрии

От штатного функционирования вакуумной системы масс-спектрометра зависит качество получаемых спектров. В случае недостаточно глубокого вакуума образовавшиеся в источнике и разделенные с помощью масс-анализатора ионы будут взаимодействовать с молекулами воздуха, не доходя до детектирующей системы, что приведет к катастрофическому снижению эффективности и чувствительности. Более того, высокое давление может послужить причиной разрушения электронных частей прибора и управляющего им компьютера из-за высоковольтного разряда, способного образоваться в этих условиях. Серьезные неполадки в вакуумной системе также опасны для масс-спектрометра.

Обычно вакуумные системы масс-спектрометров работают в 2–3 этапа. На первом достигается разряжение 10^–3^ торр (мм рт. ст.). Для этого используются форвакуумные механические насосы. Только после того как будет достигнут этот показатель, включаются более эффективные системы: диффузионные, турбомолекулярные или криогенные, которые способны достигать и поддерживать длительное время давление на уровне 10^–9^–10^–11^ торр (мм рт. ст.).

Проведение анализа

Калибровка прибора по измеряемым массам является одним из важнейших этапов проведения исследований методом масс-спектрометрии или методами, комбинированными с ней. Такая калибровка осуществляется при помощи вещества сравнения, образующего ионы известного состава в пределах области измерения масс.

Для калибровки наиболее часто применяемого в ХТА прибора ГХ-МС с ионизацией электронным ударом или химической ионизацией (образуются как отрицательные, так и положительные ионы), используют перфторкеросин [ПФК; CF3- (CF2) n-CF3] и перфтортрибутиламин [ПФТБА (перфторированный), (C4F9) 3N].

Ведущие производители оборудования для ГХ-МС исследований включают в состав программного обеспечения своего оборудования специальные программы, которые осуществляют одновременную настройку шкалы масс-прибора, а также его многочисленных ключевых показателей, таких как напряжение нити накаливания, репеллера, калибровку напряжения на квадруполе и других участках. В результате получают отчеты, в которых такие данные объединены. При проведении особо важных анализов к отчету о полученных результатах обязательно прилагается и отчет о настройке прибора, проведенной в тот же день, что остальные исследования.

Калибровка другого оборудования проводится с применением иных калибраторов, например иодида цезия для приборов с ионизацией бомбардировкой быстрыми атомами; при термораспылении применяют ацетат аммония

и полипропиленгликоль, при электрораспылении — растворы миоглобина и низших пептидов в пропиленгликоле.

Основное требование к калибратору состоит в том, что он должен давать последовательность интенсивных пиков во всем диапазоне отношений массы к заряду при рабочих условиях ионизации. Наиболее важна калибровка масс при работе масс-спектрометров высокого разрешения. Если для приборов с низким и средним разрешением можно использовать внешний стандарт для калибровки, то для обеспечения высокого разрешения калибратор вводят в ионный источник вместе с аналитом.

Определение молекулярной массы (М). Обычно исходной точкой анализа является спектр электронного удара. Изотопные кластеры в области максимальных значений *m* / *z* в МС, вероятнее всего, соответствуют молекулярным сигналам. Такое отнесение сигналов проверяется по ближайшим осколочным ионам. Наличие пиков при М-1, М-2, М-15 и М-18 обычно подтверждает это предположение, в то время как потери молекулярных масс от 3 до 14 или от 21 до 25 свидетельствуют о наличии примесей или неверной гипотезе о нахождении молекулярных пиков. Можно провести другие эксперименты — получить спектр электронного удара при более низких энергиях электронов или использовать мягкую химическую ионизацию.

Многие неполярные соединения, например полиароматические соединения, практически нечувствительны к методам мягкой ионизации. Если мягкая ионизация происходит успешно, то полезно использовать для правильного определения молекулярной массы анализируемого иона наличие других пиков, кроме протонированных, например при *m / z* = М +17, М +22 и/ или М +38, образующихся при присоединении молекул аммиака, ионов натрия или калия соответственно.

Кроме того, работа в режимах положительных ионов при образовании ионов [М + Н]^+^ или отрицательных ионов [М — Н]^–^ также помогает установить молекулярную массу. В некоторых случаях используют специальные добавки к газу-реагенту при химической ионизации, например дейтерированные соединения.

Установление молекулярной массы является сложной задачей. Информация о природе вещества и его физико-химических свойствах в большинстве случаев способствует ее решению. Немалое значение при этом имеет опыт специалиста, проводящего такие исследования.

Определение элементного состава и структуры вещества. Для определения элементного состава неизвестного соединения проводят точное измерение масс и/ или расчеты интенсивностей пиков в изотопных кластерах.

С помощью масс-спектрометра высокого разрешения можно измерить молекулярные массы с точностью до 10^–3^ Д и ниже. Однако даже с этой точностью редко получают четкое совпадение с одним элементным составом. Число возможных составов возрастает с увеличением числа элементов, которые, как предполагается, присутствуют в молекуле, и с увеличением молекулярной массы. Накопленная к настоящему времени информация о закономерностях фрагментации различных химических классов низкомолекулярных веществ позволила выработать правила, на основании которых можно с большой уверенностью говорить о присутствии или отсутствии в молекуле какой-либо химической группы, устанавливать молекулярную массу, а также наличие некоторых атомов, например хлора или брома.

Коммерчески доступные программы позволяют проводить такой анализ по МС в автоматическом режиме.

Библиотеки масс-спектров общего назначения и их основные характеристики

Библиотеки МС являются мощным средством, позволяющим выяснить структуры МС электронного удара. В большинстве из них поиск возможен в режиме on-line. Из полученной информации выбирают только небольшой объем данных о наиболее важных пиках, затем эти данные сравнивают с библиотечными спектрами. Согласие между измеренным спектром и библиотечным образцом выражается некоторым числом, обычно лежащим в диапазоне 0–1000, где значение 1000 соответствует идеальному совпадению. Десять наилучших библиотечных спектров выводятся на экран для последующей визуальной обработки пользователем.

Компьютерный поиск в библиотеках спектров указывает направление поиска в случае анализа совершенно неизвестных образцов или предоставляет надежные данные для подтверждения того, что исследуемое вещество действительно присутствует в образце. Однако следует отметить, что наиболее часто используемые библиотеки

содержат от 2000 до 500 000 МС, а количество известных соединений в настоящее время более 12 млн. Таким образом, результаты поиска в компьютерных базах данных нельзя воспринимать как истину в последней инстанции.

При использовании компьютерного поиска следует твердо придерживаться *правила*: компьютер быстро сравнивает измеренный МС с библиотечным, но окончательное решение об идентификации исследуемого соединения принимает пользователь после изучения имеющихся данных и компьютерной обработки результатов исследования.

Поиск в компьютерных базах данных при МС с ионизацией электронным ударом — достаточно мощное средство благодаря как временно́й («день ото дня»), так и межлабораторной («от прибора к прибору») воспроизводимости спектров электронного удара.

При мягкой ионизации и десорбционной химической ионизации результаты МС настолько сильно зависят от экспериментальных условий, что накопление универсальных библиотек становится невозможным. Однако иногда использование библиотек внутри лаборатории может быть оправданным.

Критерии идентификации

При исследовании методом МС в комбинации с разделительными методами (ГХ, ВЭЖХ, КЭ) в каждой лаборатории должны быть утверждены критерии идентификации, на основании которых аналитики интерпретируют полученные результаты и выдают свои заключения. Для разделительного метода и МС такие критерии должны быть свои, учитывающие особенности использованных методов.

Ниже приведены *типовые критерии* для оценки методов при определении наркотиков, стимуляторов, лекарственных веществ и их метаболитов в моче живых лиц.

Критерии для *хроматографических* методов:

* для капиллярной ГХ время удерживания аналита не должно отличаться от времени удерживания стандарта, добавленного в мочу в концентрации, близкой к обнаруженной, более чем на 1% или ±0,2 мин; * анализируемые пробы и пробы сравнения должны быть проанализированы в одно и то же время; * для ВЭЖХ время удерживания аналита не должно отличаться от времени удерживания стандарта, добавленного в мочу в концентрации, близкой к обнаруженной, более чем на 2% или ±0,4 мин.

В случаях, если разница во времени удерживания может быть объяснена, например, перегрузкой колонки, то либо переделывают пробу после разбавления, либо этот критерий ослабляется.

Критерии для *масс-спектрометрического* анализа при работе *в режиме сканирования МС:*

* снятие спектров начинают с величины m / z, превышающей все аналогичные показатели искомых аналитов или их продуктов дериватизации (если нет специальных указаний); * в выбранном диапазоне проводят сравнение спектра анализируемого вещества со спектром вещества сравнения, добавленного в мочу; при этом все пики с относительной интенсивностью более 10% интенсивности максимального пика аналитического образца сравнения должны присутствовать в исследуемом спектре; * дополнительно три характеристических иона в сравниваемых спектрах не должны отличаться по своей интенсивности больше, чем максимальные окна флуктуации показателей масс-спектрометра (табл. 5-17); * относительная интенсивность трех характеристических ионов должна быть получена путем анализа одиночного (или усредненного) спектра или по площадям пиков масс-фрагментограмм этих ионов; * вычитание хроматографического фона должно проводиться одновременно и адекватно по всем образцам; * в лаборатории должны быть установлены критерии идентификации с применением баз данных, например максимальный индекс сходимости результатов; * поиск по базам данных МС должен проводить квалифицированный специалист.

Таблица 5-17. Максимальные окна флюктуации показателей масс-спектрометра

Относитетельная интенсивность, % к максимальной интенсивности	**EI ГХ-МС**	**CI ГХ-МС**	**ГХ-МСn**	**ВЭЖХ-МС**

		ВЭЖХ-МСn
Более 50	±10% (абсолютно)	±15% (абсолютно)
25–50	±20% (относительно)	±25% (относительно)
Менее 25	±5% (абсолютно)	±10% (абсолютно)

Если не удается достичь совпадения относительных интенсивностей трех характеристических ионов в пределах 5%, используют дериватизацию или другой метод ионизации. К результатам этих исследований применяются те же критерии.

Критерии для *масс-спектрометрического* анализа при работе в *режиме сканирования характеристических ионов:*

* используют критерий относительной интенсивности трех характеристических ионов (как описано выше); при этом наименьший из выбранных пиков должен удовлетворять критерию сигнал / шум 3:1.

Особенности применения комбинированных методов ГХ-МС, ГХ-МС-МС, ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС-МС, КЭ-МС и других для определения различных токсикантов в биообъектах, а также некоторые экспертные методики, используемые в РФ, приведены в гл. 6–10.

Заключение

Для решения ряда задач ХТА и криминалистического исследования наркотиков, лекарств и ряда других объектов наиболее эффективно применить прямой ввод, и современное оборудование позволяет это сделать. Особенно полезной оказалась возможность использования масс-спектрометра в режиме тандемной МС. Метод дает возможность проводить быстрое и надежное количественное определение лекарственных средств, пестицидов, эндогенных соединений в сложных матрицах при клинической диагностике, экологических и метаболомических исследованиях с высокой производительностью при минимальной пробоподготовке.

5.4. Спектрометрические методы определения токсикантов

Если бы у меня были
тысячи глаз и тысячи рук,
я всем бы им нашел работу…
Потенциал человеческой
фантазии неисчерпаем.

Александр Леонидович Чижевский (1897–1964),
выдающийся советский ученый,
биофизик, один из основоположников
гелиобиологии, космической биологии
и космической экологии, поэт, художник,
«русский Леонардо да Винчи»,

действительный член 18 академий мира

5.4.1. Классификация, термины и определения

Спектрометрические методы анализа основаны на регистрации испускания или поглощения квантов электромагнитного излучения атомами или молекулами исследуемого вещества. Энергия испускаемого или поглощаемого излучения, о которой можно судить по длине волны или частоте излучения, дает информацию о природе вещества, а интенсивность сигнала — о его количественном содержании. В этих методах используют различные области спектра электромагнитного излучения, очень сильно различающиеся по энергии квантов.

5.4.2. Молекулярная спектрометрия
5.4.2.1. Спектроскопия в видимой и УФ-области спектра

Теория без практики мертва,
практика без теории слепа.

Александр Васильевич Суворов (1730–1800),
русский полководец, основоположник
русской военной теории,
генералиссимус, кавалер всех
российских орденов своего времении
и семи иностранных

Первые сообщения об использовании метода спектрофотометрии для определения наркотиков и ядов появились в середине XIX в. В 80-х годах XIX в. профессор химии Королевского колледжа Дувра В. Гартли предложил использовать этот метод в суде для доказательства наличия наркотиков в биообразцах. В 1884 г. в докладе на заседании Королевского химического общества в Лондоне он привел 32 спектра алкалоидов, среди которых были морфин, наркотин, кодеин, папаверин, апоморфин и др. В дальнейшем число работ увеличивалось, расширялись возможности применения этого метода.

В настоящее время спектрофотометрия в УФ и видимой областях спектра (УВИ-спектроскопия) заняла достойное место среди других методов исследования веществ. Получены и собраны значительные базы УВИ-спектров лекарственных веществ, наркотиков и других биологически активных соединений. УФ-спектроскопия получила широкое распространение в фармацевтических, токсикологических, криминалистических и других исследованиях.

УФ-спектроскопия — раздел оптической спектроскопии, включающий получение и исследование спектров испускания, поглощения и отражения в УФ-области. УФ-спектроскопию при длине волны менее 185 нм называют *вакуумной*, так как в этой области УФ-излучение настолько сильно поглощается воздухом, главным образом кислородом, что необходимо применять вакуумные или наполненные непоглощающим газом спектральные приборы. Спектроскопия в видимой области света связана с исследованием взаимодействия веществ с электромагнитным излучением, имеющим длину волны 400–700 нм. Поглощение в УФ- и видимой области является результатом переходов энергии, в которые вовлечены главным образом валентные электроны.

Спектром поглощения вещества называется кривая зависимости его способности к светопоглощению (функция поглощения) от длины волны или волнового числа. Это специфическая характеристика вещества.

Измерения чаще всего проводят для растворов, хотя их можно проводить и для веществ, находящихся в парообразном и твердом состоянии, аналогично получению ИК-спектров с применением газовых кювет или путем прессования таблеток с бромидом калия (см. далее).

Спектры жидких образцов представляют собой широкие, относительно невыразительные полосы светопоглощения, которые являются результатом наложения большого количества близко расположенных полос, соответствующих вибрационным и вращательным переходам электронов. В идеальном случае форма этих линий приближается к форме кривых распределения Гаусса. Использование неполярного растворителя приводит к появлению на спектре ряда узких полос, в газовой фазе детализация спектра усиливается. Такая закономерность характерна для подавляющего большинства веществ.

Положение и форма полосы светопоглощения определяемого вещества в растворе, а также возможность присутствия других компонентов, поглощающих в этом же диапазоне волн, ограничивают (из-за наложения полос поглощения) применение метода в качественном анализе.

Для идентификации анализируемого вещества в известном растворителе при фиксированном значении pH среды определенная полоса поглощения УФ-спектра имеет диагностическое значение.

Преимущества УФ-спектроскопии:

* возможность получать надежные количественные результаты (относительная погрешность измерения не превышает 2–3 отн. %); * возможность исследовать водные растворы наркотических средств и других токсикологически значимых веществ; * отсутствие влияния на результаты измерения различных

наполнителей — моносахаридов, крахмала, муки, солей стеариновой кислоты, во многих случаях и соэкстрактивных веществ.

УФ-спектроскопия (спектрофотометрия) — простой и достаточно экспрессный метод количественного определения веществ — проводится только *после идентификации* определяемого вещества каким-либо *другим методом* анализа (ТСХ, ИК-спектрометрией, ГХ-МС и др.).

Возможности УФ-спектроскопии могут быть расширены с применением химических способов, приводящих к переводу исследуемых веществ в производные, обладающие поглощением в УФ- и/ или видимом свете. При этом увеличиваются селективность и чувствительность определения. Особенно часто такой подход применяют в ТСХ и ВЭЖХ при УФ-детектировании (см. п. 5.3).

Способность поглощать свет определенной длины волны является фундаментальным свойством молекул вещества.

Объединенный основной закон светопоглощения Бугера–Ламберта–Бера, которому подчиняются все вещества, может быть выражен в экспоненциальной форме:

I = *I*~0 ~*e*^ — ^^*kcl*^

или в логарифмической форме:

A = ε*cl*,

где I — интенсивность излучения (светового потока), прошедшего через эту среду (I <*I*~0~); *I*~0~ — интенсивность монохроматического излучения (светового потока), падающего на данную светопоглощающую среду; e — основание натуральных логарифмов; k — коэффициент (показатель) поглощения света (коэффициент светопоглощения); c — концентрация светопоглощающих частиц в данной среде; l — толщина светопоглощающего слоя; A = lg (*I*~0 ~/ *I*) — оптическая плотность (absorbance), или экстинкция (E), погашение (иногда в старых изданиях обозначают как D); ε = k/2,3 = 0,43478k — коэффициент (показатель) погашения, или коэффициент экстинкции (absorptivity), который нередко называют и коэффициентом (показателем) поглощения (см. ниже).

Основной закон светопоглощения справедлив только для поглощения монохроматического светового потока с постоянной длиной волны.

Величину ε называют *молярным* коэффициентом погашения или молярным коэффициентом экстинкции (табл. 5-18), если концентрация раствора *c* выражена в единицах моль / л, а толщина поглощающего слоя *l* — в сантиметрах (*A* — безразмерная величина).

Таблица 5-18. Способы представления коэффициентов погашения

Коэффициент	**Используемые единицы измерения концентрации раствора**	**Обозначение и единицы измерения коэффициента**	**Представление**
Молярный коэффициент (показатель) погашения*	моль / л	ε, л / (моль·см) или л · моль^ –1^·см^ –1^	Численно равен оптической плотности данного раствора при концентрации растворенного светопоглощающего вещества 1 моль / л и толщине поглощающего слоя 1 см
Удельный коэффициент (показатель) погашения (нередко называют не вполне точно удельным коэффициентом поглощения)	1 г / 100 мл раствора	*E*^1%^~1 см~ *E* (1%, 1 см)	Численно равен оптической плотности данного раствора с массовой концентрацией 1 г растворенного светопоглощающего вещества в 100 мл

			раствора при толщине поглощающего слоя 1 см
Поглотительная способность**	1 г / л	а, л / (г·см)	Численно равна оптической плотности данного раствора с концентрацией 1 г растворенного светопоглощающего вещества в 1 л раствора при толщине поглощающего слоя 1 см

* Иногда эта величина может выражаться через десятичный логарифм, обычно принимая значения от 1 до 5.

** Используется редко.

Молярный и удельный коэффициенты погашения связаны соотношением

$$\varepsilon = E \cdot \frac{M}{10},$$

где *M* — молярная масса растворенного вещества.

Коэффициент (показатель) поглощения k и коэффициент (показатель) погашения (экстинции) ε различаются в 2,3 раза.

В аналитических исследованиях практически всегда используют ε, хотя его часто называют коэффициентом поглощения. Это следует иметь в виду, чтобы избежать получения ошибочных результатов.

Корреляция спектров абсорбции с молекулярной структурой вещества

При абсорбции электромагнитного излучения атомы, ионы или молекулы вещества переходят в другое (более высоколежащее) энергетическое состояние на строго определенную величину. Каждому разрешенному электронному (вернее электронно-колебательному) переходу соответствует определенная полоса в электронном спектре поглощения, т. е. длина волны (частота, волновое число) максимума полосы поглощения. Интенсивность полосы поглощения зависит от вероятности перехода в другое энергетическое состояние и от концентрации светопоглощающих частиц. *Чем выше величина ε вещества (а это означает большую вероятность перехода), тем выше интенсивность полосы поглощения в спектре.* Энергия разрешенных правилами отбора электронных переходов системы возрастает в ряду: $n \rightarrow \pi^* < < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$. В такой же последовательности возрастает частота и уменьшается длина волны полосы соответствующего перехода в спектре поглощения.

Химические группы, содержащие в своем составе электроны, способные осуществлять определенные энергетические переходы, называют *хромофорами.* Чем больше хромофорных групп содержит молекула, тем более интенсивно она поглощает электромагнитное излучение. Например, увеличение числа сопряженных двойных связей в молекуле с 2 до 5 приводит к увеличению ε~max~ в 5,6 раза и λ~max~ с 210–230 до 330 нм. Хромофоры обусловливают появление полос поглощения в электронных спектрах, в то время как *ауксохромы* способны изменить степень или характер поглощения света другими хромофорами вследствие эффектов сопряжения в молекуле (ауксохромы сдвигают положение максимума поглощения λ~max~ хромофора). Ауксохромные группы (в молекулах органических соединений) могут быть электронодонорами и электроноакцепторами.

Если вещество при изменении pH раствора ионизируется без деградации структуры (обратимо), то изображенные вместе спектры поглощения, полученные для растворов одинаковой концентрации этого вещества, но при разных значениях pH, будут иметь одну или несколько изобестических точек. Выражение *«изобестическая»* или *«изосбестическая точка»* (греч. *изос* — равный и *сбестос* — гасящий, тушащий) означает «точка равного погашения», т. е. *общая точка пересечения серии спектральных кривых* (*isosbestic point)*. Например, если в растворе находятся две формы вещества (AгOH < — >AгO^–^), то семейство кривых поглощения, соответствующих различным значениям pH раствора, будет иметь одну точку, при которой поглотительная способность вещества остается постоянной, не зависящей от отношения концентраций AгOH / AгO^ — ^. Наличие

изобестической точки зависит лишь от общего числа одинаковых хромофоров для двух видов частиц, находящихся в равновесии. На рис. 5-20 показана серия УФ-спектров органического красителя, полученных при разных значениях pH среды.

Как видно на рис. 5-20, все линии пересекаются в одной точке, близкой к 250 нм. В этой точке поглощение вещества не зависит от pH среды. *Наличие изобестических точек помогает при идентификации вещества.* Кроме того, это свойство некоторых веществ используется при проверке надежности аппаратуры.

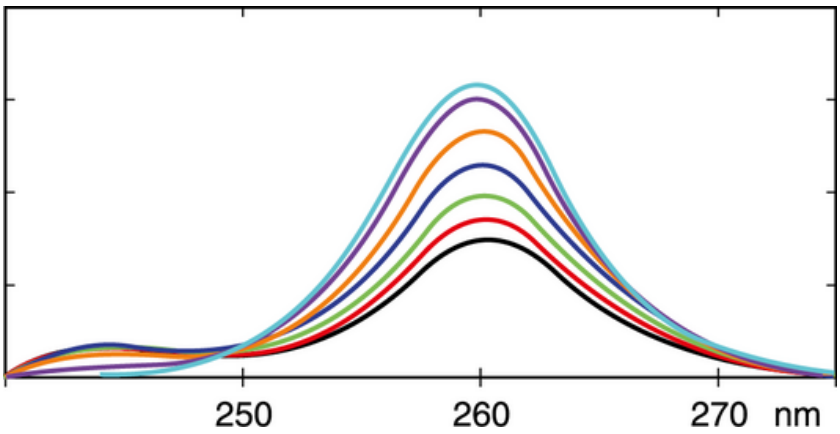


Рис. 5-20. Ультрафиолетовые спектры и изобестическая точка

В зависимости от условий среды у ряда веществ изменяется способность к поглощению в УФ- и видимой области света, что является важной характеристикой вещества. Например, при изменении pH среды (при переходе из кислой области в щелочную) в УФ-спектрах веществ, содержащих фенольные группы, происходит смещение максимумов поглощения в сторону бóльших длин волн — *батохромный,* или красный, сдвиг (смещение). Батохромный сдвиг (до 10 нм) характерен для наркотических веществ со свободным фенольным гидроксилом группы морфина, фенотиазинов, барбитуратов, бензодиазепинов, пиридонов и нитросоединений. На рис. 5-21 приведены структуры фенобарбитала (при различных значениях pH среды) и соответствующие им УФ-спектры. При pH 9,2 в УФ-спектре фенобарбитала появляется характерная полоса поглощения при 240 нм. Значения pH среды 13,0 и более приводят к дальнейшему смещению максимума поглощения, однако в этих условиях вещество быстро разрушается.

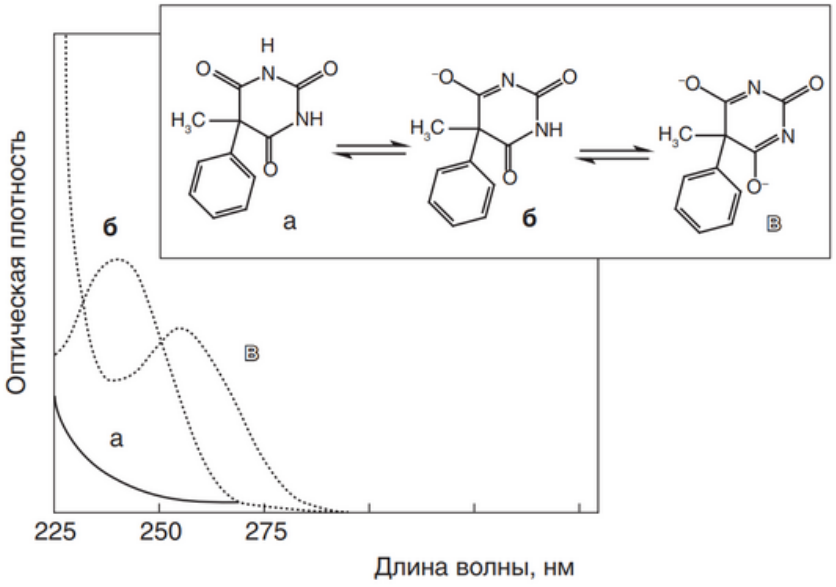


Рис. 5-21. Ультрафиолетовые спектры фенобарбитала при различных значениях pH среды и соответствующие им молекулярные структуры: а — неионизированная форма фенобарбитала в 0,1 М растворе HCl; б — моноанион фенобарбитала в 0,05 М растворе боратного буфера (pH 9,2); в — дианион фенобарбитала в 0,5 М растворе гидроксида натрия (pH 13,0)

Гипсохромное, или синее, смещение — сдвиг полосы поглощения в коротковолновую область — характерно, например, для ароматических аминов в кислой среде.

Увеличение или уменьшение интенсивности полосы поглощения из-за влияния различных факторов, в том числе из-за влияния ауксохромов, называют **гиперхромным и гипохромным эффектом** соответственно.

Принцип аддитивности оптических плотностей, или *принцип К. Фирордта*: оптическая плотность смеси из *m* веществ, подчиняющихся закону Бугера–Ламберта–Бера и не вступающих в химическое взаимодействие друг с другом, равна сумме парциальных оптических плотностей компонентов при постоянных длине волны светового потока и толщине светопоглощающего слоя.

Уравнение Фирордта:

$$D = \varepsilon_1 c_1 l + \varepsilon_2 c_2 l + \ldots + \varepsilon_m c_m l = l \sum_{i=1}^{m} \varepsilon_i c_i,$$

где *D* (или *A*) — оптическая плотность, ε~1~, ε~2~…ε~*m*~ — молярные коэффициенты погашения компонентов раствора; *c*~1~, *c*~2~…*c*~*m*~ — концентрации компонентов раствора; *l* — длина кюветы.

На этом *принципе* основаны методы количественного определения веществ в смесях, в том числе выделенных из биологического материала.

На практике *линейная концентрационная зависимость* оптической плотности раствора для многих веществ наблюдается только в относительно *небольшом интервале изменения* концентраций. За пределами этого интервала могут наблюдаться *кажущиеся отклонения* от основного закона светопоглощения (и положительные, и отрицательные). Отклонения называют кажущимися, так как основной закон светопоглощения не нарушается, а изменяется число светопоглощающих частиц и/ или прибор неточно регистрирует истинную интенсивность светового потока, прошедшего через раствор.

Факторы, влияющие на линейность закона Бугера–Ламберта–Бера

Основной закон светопоглощения справедлив для проходящего через гомогенную изотропную среду плоскопараллельного пучка монохроматического света.

Причины отклонений от этого закона связаны:

1) с физико-химическими свойствами анализируемого вещества или всего раствора в целом;

2) особенностями используемого оборудования (инструментальные причины);

3) анизотропией изучаемого объекта.

1. *Физико-химические свойства исследуемых растворов.* Отклонения от закона Бугера–Ламберта–Бера в основном обусловлены реакциями диссоциации и ассоциации, химическим взаимодействием растворенного вещества с растворителем или реакциями комплексообразования, фотодеградации и другими реакциями, особенно приводящими к образованию веществ с коэффициентами погашения, отличающимися от коэффициента погашения исходного вещества.

На результаты исследований оказывают влияние:

* природа используемого растворителя; * однородность раствора; * процессы, способные привести к изменению его поглотительной способности, например флуоресценция.

Выбор растворителя при проведении спектроскопических исследований имеет большое значение. При снятии УФ-спектров многих токсикологически значимых веществ в неполярных растворителях наблюдают несколько интенсивных узких полос поглощения, а при использовании полярных растворителей наблюдают сокращение полос поглощения при одновременном их уширении.

В электронной спектроскопии можно использовать любые растворители, прозрачные в необходимом диапазоне длин волн (табл. 5-19). При определении лекарственных препаратов и наркотиков, в том числе в биологических объектах, чаще всего используют 95% раствор этанола (водный), растворы минеральных кислот или щелочей.

Таблица 5-19. Основные растворители, используемые в ультрафиолетовой спектроскопии

Растворитель	**Допустимый предел использования: прозрачен до длины волны, нм**
Вода или разбавленная неорганическая кислота	190
Ацетонитрил (чистый для ВЭЖХ)	200
Ацетонитрил	210
Бутиловый спирт	210
Циклогексан	210
Этанол (95% раствор)	210
Гептан	210
Гексан	210
Изопропанол	210
Метанол	210
Эфир	220
0,2 М раствор натрия гидроксида	225
Дихлорэтан	230
Метиленхлорид	235
Хлороформ	245
Четыреххлористый углерод	265
Бензол	280
Пиридин	305
Ацетон	330

Флуоресценция исследуемого раствора приводит к увеличению светопотока, попадающего на фотодетектор, и, соответственно, к занижению получаемых количественных результатов. Наблюдаемый эффект сильно зависит от длины светового пути (длины кюветы). *При прочих равных условиях отклонения от закона Бугера–Ламберта–Бера из-за флуоресценции будут возрастать при увеличении оптической плотности раствора и уменьшаться с повышением концентрации растворенного вещества*.

Фотометрические измерения не рекомендуется проводить при очень малых или больших величинах оптической плотности растворов. *Оптимальный рабочий интервал измерения оптической плотности — 0,2–0,6 единицы (диапазон 0,2–0,8); наименьшую ошибку получают при A = 0,434.*

2. *Инструментальные причины.* Наиболее частой инструментальной причиной отклонений от рассматриваемого закона является немонохроматичность падающего на образец светового потока. Обычно интервал длин волн *s* определяется шириной выходной щели *h* и дисперсией монохроматора

$$\frac{d\lambda}{dl}$$

:

$$s = h\frac{d\lambda}{dl}.$$

Увеличение ширины щели, как правило, приводит *к падению* кажущегося коэффициента погашения в области *максимума* поглощения и *одновременно* к его *увеличению* в области *минимума* поглощения. Эти нарушения малозаметны на спектрах веществ с широкими полосами абсорбции, но могут быть очень резкими для узких зон поглощения.

Чтобы *избежать искажения* спектров, особенно при количественных определениях, *ширину щели* устанавливают много *меньшей,* чем *полуширина* исследуемой полосы (ширина, измеренная на полувысоте полосы поглощения).

При проведении измерений вблизи пограничных значений пределов измерения прибора, особенно ниже 220 нм и в зоне перехода УФ-света в видимый, где происходит переключение соответствующего источника света у современных спектрофотометров, возможно получение некорректных результатов. Это диапазон длин волн от 320 до 400 нм. Особенно следует обращать внимание на указанные факторы при проведении измерений с использованием сильнопоглощающего УФ-свет растворителя или при дифференциальном анализе сильноабсорбирующих веществ.

Присутствие рассеянного света также искажает результаты исследований методом спектроскопии. Под рассеянным светом в данном случае понимают полихроматическое излучение, попадающее в измерительную камеру прибора в результате различных отражений и рассеяний в диспергирующей системе. К такому явлению приводят дефекты в призмах, зеркалах, дифракционных решетках или кюветах, налеты различных веществ из атмосферы или пыль, отпечатки пальцев на поверхностях указанных деталей и др. (см. далее).

3. *Анизотропия исследуемых объектов.* Пропорциональность между оптической плотностью и концентрацией вещества нарушается из-за неравномерности распределения поглощающего вещества в пучке света. Особенно такая ошибка заметна при проведении исследований микроспектрофотометрическим методом.

Чрезвычайная интенсивность света, например от лазера, может приводить к тому, что подавляющая часть молекул анализируемого вещества окажется в возбужденном состоянии и в конечном счете будет наблюдаться отклонение от закона Бугера–Ламберта–Бера.

Оборудование для исследований методом УФ-спектроскопии

Оборудование для проведения исследований включает:

* источник света; * устройство для исследования проб; * детектор; * устройство для обработки данных.

Источники излучения

* вольфрамовые лампы накаливания (tungsten lamp) используют в видимой области для получения излучения в диапазоне от 350 до 800 нм. Обычно представляют собой кварцевые или стеклянные сосуды, в которых имеется вольфрамовая нить накаливания; * водородные или дейтериевые лампы (^2^H lamp) используют для получения УФ-света в диапазоне от 160 до 350 нм. По конструкции напоминают вольфрамовые лампы, но заполнены водородом и имеют в составе два электрода; * ксеноновые лампы (Xe lamp) используются для получения интенсивного потока излучения в диапазоне от 200 до 1000 нм; применяются редко из-за дороговизны и короткого срока работы; * лазерные источники излучения применяют для детектирования веществ тандемными методами, например для детектирования элюирующихся из хроматографической колонки веществ.

Устройства для исследования проб

При определении наркотических средств и лекарственных веществ методом УВИ-спектрометрии чаще всего используют жидкие образцы или растворы. Для исследования образцы помещают в специальные кюветы, изготовленные из кварца или стекла, реже из полимерных материалов.

Кюветы из кварца прозрачны при длинах волн ниже 350 нм, однако они достаточно дороги (около 3000 руб. за штуку). Обычно используют кюветы с длиной светового пути от 0,1 до 10 см.

Стеклянные кюветы применяют для работы в видимой части спектра, так как они прозрачны в диапазоне от 350 до 2000 нм и относительно дешевы.

Пластиковые (одноразовые) кюветы применяют при проведении исследований в видимой области света, так как они пропускают свет в диапазоне от 350 до 900 нм. Следует обратить внимание на то, чтобы используемый растворитель не растворял стенки или не вымывал из них посторонние вещества, которые могут влиять на качество получаемых результатов. С этой же целью необходимо тщательно следить за поверхностью кювет, тщательно их промывать после работы, оберегать от механических повреждений. Последнее касается всех видов кювет. Отдельные кюветы в ряде случаев конструктивно объединяются в систему кювет или ячеек, образуя специальные блоки кювет для многоканальных фотометрических приборов. Они называются в зависимости от конструктивного исполнения планшетами, стрипами и т. п.

Разновидностью конструктивного исполнения контейнеров для образца является проточная кювета. В таких кюветах образец подается в измерительную проточную ячейку по тефлоновым трубкам, прикрепленным к входному и выходному отверстиям ячейки. Для подачи образца в измерительную ячейку обычно используется перистальтический насос. Проточные кюветы обеспечивают постоянную величину пути для светового потока и быстроту замера оптической плотности образца. Между замерами ячейка автоматически промывается.

Для обеспечения кинетических исследований в фотометрических приборах предусматривается термостатирование кюветы с поддержанием заданной температуры раствора (реакционной смеси).

Детекторы излучения

Во всех приборах для спектроскопических исследований для преобразования светового потока в электрический сигнал используются специальные устройства (фотоэлектронные умножители, фотоэлементы, фотодиоды и фотодиодная матрица), называемые детекторами.

Фотоэлектронный умножитель преобразует световую энергию в электрические импульсы, которые усиливаются и поступают на считывающее устройство. Принцип действия современных трубчатых фотоумножителей основан на использовании специальной трубки из фоточувствительного металла, который поглощает световую энергию, испуская электроны в количестве, пропорциональном падающей лучистой энергии.

Фотоэлемент (фототрубка) состоит из светочувствительного катода, изогнутого трубкой и покрытого цезием, и узкого цилиндрического анода. Испускаемые катодом электроны собираются на аноде, образуя во внешней цепи ток, поступающий на датчик для измерения.

Фотодиод (светочувствительный диод, LDD) обычно изготавливается из кремниевого материала, а в более современных разработках применяются кремниевые микросхемы, которые преобразуют энергию светового потока в измеряемый электрический сигнал.

Фотодиодная матрица представляет собой набор (линейку) фотодиодов, работающих в комплексе друг с другом.

В рекомендуемой литературе (см. список литературы, в том числе к первому изданию учебника) приведена информация, важная для практической работы эксперта:

* принцип работы и устройство фотоколориметра; * принцип работы и устройство фотометра, однолучевого и двулучевого спектрофотометров; * принцип работы и устройство спектрофотометра с фотодиодной решеткой.

Метрологические вопросы спектрофотометрии

Правильность спектрофотометрических данных. Правильность данных спектрофотометрии оценивают по результатам исследования аналитических образцов сравнения (эталонов, стандартов), свойства которых считаются известными, в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725–1–2002 «Точность (Правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения». Согласно стандарту: *«Правильность*

(trueness) — это степень близости среднего значения, полученного на основании большой серии результатов измерений (или результатов испытаний), к принятому опорному значению».

Спектрофотометрические исследования дают результаты, выражаемые в единицах длины волны (частота) и единицах оптической плотности (пропускание). Соответственно методика поверки должна предусматривать определение этих двух показателей работоспособности оборудования.

Поверка шкалы длин волн. Поверку шкалы длин волн обычно проводят по спектру излучения ртутной лампы. В этом спектре имеется ряд узких пиков, положение которых известно с точностью до 0,001 нм. Текущий контроль шкалы проводят по растворам солей редкоземельных элементов, обладающим узкими полосами поглощения.

В ГФ РФ XIV издания регламентируется положение: «При измерении на разных спектрофотометрах значения характеристических длин волн могут отличаться на ±2 нм. Если отличие превышает указанный предел, то необходимо провести калибровку шкалы длин волн».

Европейская и Британская фармакопеи устанавливают более строгие границы длин волн. С этой целью используются как полосы поглощения ртутной и дейтериевой ламп, так и полосы поглощения 4% раствора (масса / объем) оксида гольмия в 1,4 М перхлорной кислоте. Допустимые расхождения для УФ-диапазона составляют ±1 нм, для видимой области света ±3 нм. В табл. 5-20 приведены полосы поглощения, по которым проводится поверка.

Таблица 5-20. Полосы поглощения, по которым проводится поверка шкалы длин волн

Источник света	**Полосы поглощения, нм**
Раствор оксида гольмия в перхлорной кислоте	241,15; 253,7; 287,15; 361,5; 536,3
Ртутная лампа	302,25; 313,16; 334,15; 365,48; 404,66; 435,83; 546,07; 576,96; 579,07
Дейтериевая лампа	486,0
Водородная лампа	486,1

В настоящее время некоторые фирмы выпускают специальные поверочные фильтры.

Поверка шкалы абсорбции. Для проверки шкалы пропускания ГФ РФ XIV издания регламентирует использование стандартного образца — раствора, содержащего 60,06 мг дихромата калия в 1000 мл серной кислоты (0,005 моль / л) при толщине слоя 10 мм. Оптическую плотность этого раствора измеряют несколько раз при длинах волн 235, 257, 313 и 350 нм, соответствующих максимумам и минимумам поглощения. Рекомендуемые средние значения оптической плотности: 0,7483 для 235 нм, 0,8645 для 257 нм, 0,2916 для 313 нм и 0,6403 для 350 нм. Стандартные отклонения этих величин не должны превышать 0,004 для 235 нм и 0,002 для прочих длин волн.

Для поверки работы прибора при более коротких длинах волн можно использовать раствор никотиновой кислоты (0,016 399 г / кг в 0,1 М HCl), оптическая плотность которого при 210 нм равна 0,7593.

Поверка влияния рассеянного света. Поверку обычно осуществляют при определенной длине волны с использованием конкретного раствора или светофильтра. Например, абсорбция 1,2% раствора натрия хлорида в воде должна быть не менее 2 ед. при длине светового пути 1 см и использовании воды в качестве образца сравнения.

Поверка разрешающей способности. Обычно в спектроскопии для поверки разрешающей способности оборудования используют стандартные смеси веществ с известными спектральными характеристиками. Например, Британская фармакопея 2001 г. для этих целей, если в конкретной статье прописано проведение такой проверки, регламентирует использование 0,02% раствора (объем / объем) толуола в гексане при использовании в качестве вещества сравнения толуола. При этом отношение поглощения при максимуме 269 нм к поглощению при минимуме полосы пропускания при 266 нм должно соответствовать данной конкретной фармакопейной статье.

Если проводят исследование в режиме производной спектрофотометрии (см. ниже), для проверки разделяющей способности оборудования используют следующий подход. Для 0,020% раствора толуола в метаноле записывают спектральную кривую второй производной в диапазоне 255–275 нм относительно метанола. На спектре между

полосами поглощения 261 и 268 нм должны быть две точки экстремума. На рис. 5-22 показан спектр такого раствора и отмечены точки, необходимые для измерения. Соотношение *A/ B* должно быть, как правило, не ниже 0,2, если не оговорено специально.

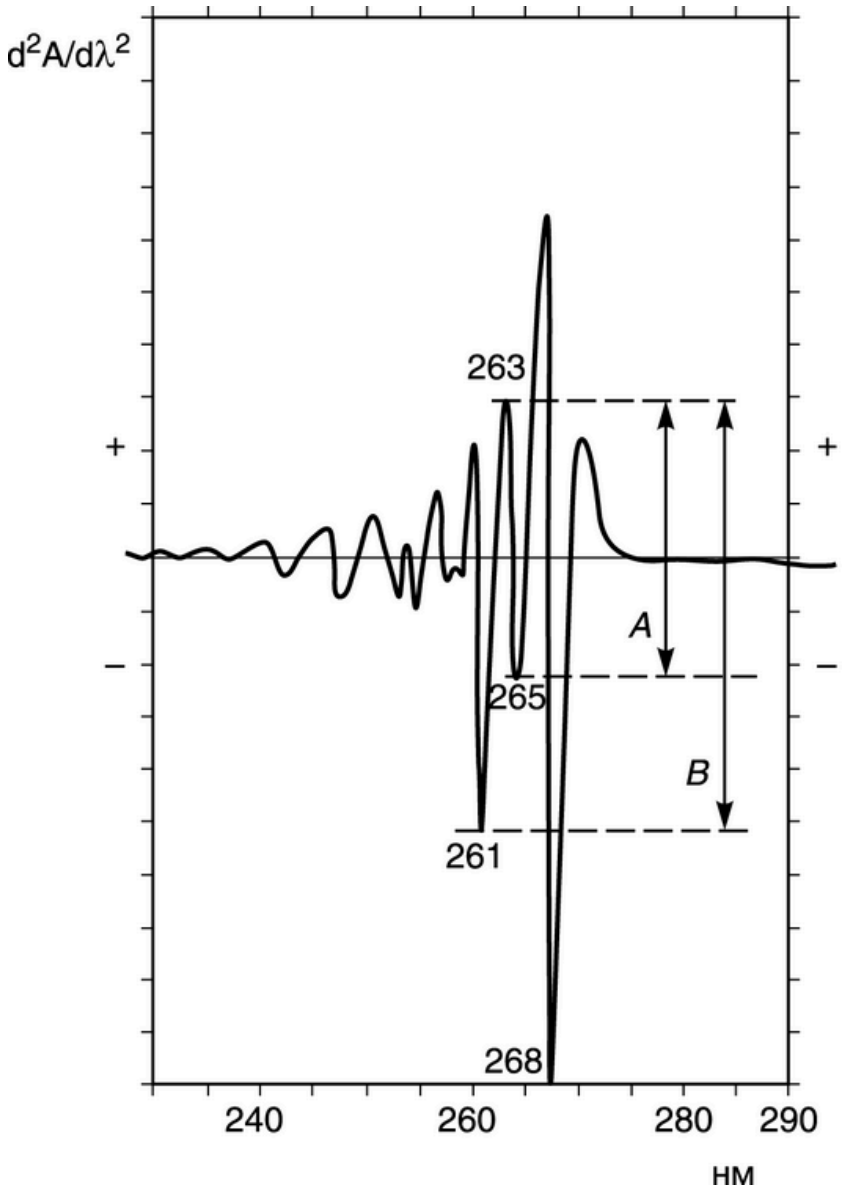


Рис. 5-22. Ультрафиолетовая спектральная кривая второй производной раствора толуола в метаноле

Воспроизводимость спектрофотометрических данных. Основные факторы, влияющие на воспроизводимость результатов спектрофотометрического измерения, следующие.

* Химические и фотохимические: случайные погрешности в приготовлении анализируемого раствора; влияние мутности раствора и флуоресценции анализируемого вещества или содержащихся в растворе примесей. * Кюветная погрешность: нескомпенсированное из-за разной толщины кювет поглощение растворителя, разное светопоглощение кювет, многократные внутренние отражения света в кюветах. Последняя причина вызывает при обычных условиях погрешность 0,05–0,2% пропускания. Наиболее существенным компонентом кюветной погрешности является невоспроизводимость положения кювет относительно оптического пучка. * Погрешность холостого опыта, складывающаяся из погрешностей в приготовлении растворов и влияния их летучести или способности к флуоресценции. Возможно несколько способов учета оптической плотности холостого раствора, из которых наиболее точным является непосредственное измерение оптической плотности испытуемого раствора относительно холостого. * Погрешность установки аналитической длины волны, складывающаяся из погрешности отсчета по шкале длин волн и несоответствия положения диспергирующего элемента (призма, решетка) и указателя на шкале длин волн (т. е. проявление гистерезисаГистерезис (греч. hysteresis — отставание) — запаздывание изменения физической величины, характеризующей состояние вещества, от изменения другой физической величины, определяющей внешние условия. Гистерезис

наблюдается в тех случаях, когда состояние тела определяется внешними условиями не только в данный момент времени, но и в предшествующие моменты. Наиболее важны магнитный гистерезис, сегнетоэлектрический гистерезис и упругий гистерезис.).

Качественный анализ

Широко применяются способы химического модифицирования аналита, которые позволяют в сложной смеси исследовать само вещество, его метаболит или примесь (например, продукт полусинтеза) путем смещения максимумов поглощения в УФ-спектре полученного деривата в длинноволновую область.

Провести полную *идентификацию* вещества на основе *только результатов УФ-спектроскопии* без привлечения дополнительных данных об аналите практически *невозможно*. Однако наличие максимумов поглощения у исследуемого вещества может пригодиться для предварительной идентификации. *В ХТА* УФ-спектроскопия *расценивается* как метод, имеющий *отрицательное судебно-химическое значение* (см. гл. 4, 6, 7).

При подозрении, что в исследуемом образце присутствует вещество, способное интенсивно поглощать в УФ- или видимой области света, обычно проводят регистрацию спектров в кислой и щелочной водных средах, а также в органическом растворителе, например в метаноле или этаноле. Полученные значения максимумов поглощения сравнивают с библиотечными значениями. К настоящему времени обобщены УФ-спектральные характеристики многих сотен токсикологически важных веществ и их метаболитов, что позволяет использовать полученные данные в ХТА. Обычно поиск по базам данных осуществляется с точностью до ±2 нм.

Количественное определение

Количественный спектрофотометрический анализ вещества, поглощающего свет, сводится к определению его концентрации в растворе по установленной оптической плотности испытуемого раствора и раствора стандарта с известной концентрацией при определенной длине волны, обычно соответствующей максимуму поглощения этого вещества. Области переключения источников излучения являются неблагоприятными для исследования.

Для уменьшения ошибки измерения при исследовании образцов, в состав которых входит только одно вещество с удовлетворительной способностью к поглощению света, выбирают длину волны, соответствующую максимуму поглощения этого вещества. Такой подход чаще всего используют при исследовании лекарственных препаратов, например инъекционных растворов кетамина. Другой пример. При количественном определении моноксида углерода в крови пострадавших (см. п. 7.3) ВОЗ рекомендует использовать изобестическую точку (λ = 579 нм).

Во многих случаях точное измерение поглощения света веществом при определенной длине волны бывает затруднено из-за неспецифического поглощения материалом кюветы, растворителем или компонентами образца. Для уменьшения воздействия этого фактора разработано несколько подходов, среди которых геометрический метод Мортона–Стубба, дифференциальная спектрофотометрия, математические методы или методы химической модификации исследуемого вещества с целью изменения положения максимума его поглощения и др. Некоторые из них описаны ниже.

Дифференциальная спектрофотометрия

Кроме метода непосредственной спектрометрии, большое распространение получил метод дифференциальной спектрофотометрии. При измерении светопоглощения анализируемого раствора относительно среды сравнения, оптическая плотность которой значительно больше нуля, используют метод спектрофотометрии, называемый дифференциальным. *Дифференциальный метод анализа* используют для повышения точности спектрофотометрических и фотоколориметрических измерений *при определении высоких концентраций веществ* (от 10 до 100%).

Сущность метода заключается в измерении светопоглощения анализируемого раствора относительно раствора сравнения, содержащего определенное количество испытуемого вещества; это приводит к изменению рабочей области шкалы прибора и снижению относительной ошибки анализа до 0,5–1%.

Концентрация вещества в образце сравнения *C*~0~ обычно меньше его концентрации в анализируемом образце *C*~*x*~, хотя это и не обязательно. Пропускание (*T*~отн~) анализируемого раствора по отношению к раствору сравнения будет равно:

$$T_{\text{отн}} = 10^{-\varepsilon(c_x - c_0)l}.$$

Далее рассчитывают *C*~*x*~.

Если ввести *фактор пересчета F* = 1 / ε*l*, то *C*~x ~= *C*~0 ~+ *FA*~*x*~ и расчеты значительно упрощаются. Фактор пересчета *F* находят по результатам измерений *оптических плотностей эталонных растворов* относительно эталонного раствора с концентрацией *C*~0~.

Для дифференциальной спектрофотометрии, кроме погрешностей, общих для непосредственной спектрофотометрии, характерны свойственные только этому методу погрешности. Например, с ростом *A*~0~ значительно увеличивается ширина щели спектрофотометра, что приводит к нарушению монохроматичности света, уменьшению коэффициентов поглощения веществ и угла наклона калибровочного графика. Также увеличивается влияние рассеянного света на результаты измерения. При уровне *рассеянного света* 1% использование *A*~0~ >1,5 *не имеет смысла,* так как калибровочный график становится параллельным оси абсцисс.

Дифференциальная спектрофотометрия повышает требования к используемому оборудованию, качеству кювет и квалификации сотрудников, проводящих измерения. Используют различные варианты дифференциальной спектрофотометрии.

Производная спектрофотометрия. Производную спектрофотометрию относят к одному из вариантов дифференциальной спектрофотометрии. Улучшение разрешения отдельных полос поглощения и повышение селективности спектрофотометрического определения достигаются при переходе к спектральным кривым второй, а иногда и четвертой производной. В производной спектрофотометрии измеряют разность светопоглощения при двух длинах волн λ~1 ~и λ~2~, разделенных малым интервалом Δλ = λ~1 ~— λ~2~. Предел отношений разности оптических плотностей при двух длинах волн (Δ*A* к Δλ) равен математической первой производной и является функцией от длины волны: *dA* / *d*λ = *f* (λ). Дифференцирование позволяет *уменьшить ширину* полосы основного пика и *увеличить разрешение перекрывающихся* в исходном спектре полос, при этом малохарактерное поглощение подавляется, а *характерные полосы* даже при *малой интенсивности усиливаются.*

Существенным *недостатком* данного вида спектрофотометрии является резкое снижение отношения сигнал / шум. Результаты анализа во многом зависят от качества получаемых спектров.

Двулучевая и многоволновая спектрофотометрия

Эти способы спектрофотометрии широко используются при анализе биологических объектов, для количественного определения примесей в реактивах и контроля над ходом синтеза (например, лекарственных препаратов), в комбинированных методах исследования, например, ВЭЖХ со спектральным детектированием (см. гл. 6–10).

Такая модификация метода спектрофотометрии позволяет устанавливать разность поглощения исследуемого раствора при двух или более длинах волн (см. гл. 6 и 7).

Двулучевая спектрофотометрия предпочтительна:

* при наличии в растворах поглощающих или рассеивающих свет примесей; * при малых значениях оптической плотности; при ε^λ1^/ε^λ2 ^⟶ 0

5.4.2.2. Спектрометрия в ИК-области спектра, Раман-спектрометрия, ИК-Фурье-спектрометрия, методы НПВО и МНПВО

Основная идея всегда должна
быть недосягаемо выше,
чем возможность ее исполнения.

Федор Михайлович Достоевский (1821–1881),
великий русский писатель,
классик мировой литературы,
мыслитель, философ, ученый

Химия создала свой предмет. Эта творческая
способность, подобная искусству, коренным образом
отличает химию от остальных естественных наук.

Пьер Эжен Марселен Бертло (1827–1907),
известный французский физико-химик,
один из основоположников органического синтеза,
политический деятель

В ИК-области спектра энергия поглощаемого излучения достаточна лишь для изменения колебаний и вращения молекул. ИК-спектры существенно сложнее электронных, потому что именно в этой области спектра находятся характеристические колебательные частоты, отвечающие внутренним колебаниям отдельных групп атомов и фрагментов многоатомных молекул. Эксперименту доступны: ближняя ИК-область с частотами 13 000–5000 см^ –1^, фундаментальная (средняя) — 5000–400 см^ –1^ и дальняя — 400–10 см^ –1^.

В ИК-области активны те молекулы, в которых при колебаниях атомов изменяется дипольный момент. Двухатомные молекулы, у которых нет дипольного момента, например водород, азот или кислород, не поглощают в ИК-области. Полная симметрия в структуре молекулы не дает возможности проявиться некоторым видам поглощения, например, симметричная молекула этана не дает углерод-углеродных полос поглощения.

Различие в строении молекул отражается в их колебательных спектрах. Этот факт — основа идентификации соединений**.** В процессе съемки спектра осуществляется сканирование поглощения с изменением частоты ИК-излучения, что позволяет зарегистрировать **ИК-спектр** — зависимость пропускания T от волнового числа *ṽ*(см^–1^)Поглощение ИК-излучения фиксируется как ослабление интенсивности *I* прошедшего через образец света по отношению к исходной интенсивности *I*~0~ и выражается в виде процента пропускания: *T*% = *I* / *I*~0 ~× 100. *T*% записывается на оси ординат ИК-спектра, а по оси абсцисс откладывается длина волны λ в микрометрах (мкм) или (чаще) волновое число *ṽ*(1 / λ) в обратных сантиметрах (см^ — 1^), иногда неправильно называемое частотой.∗. Анализируя полученный спектр, можно определить, какие группы атомов присутствуют или отсутствуют в исследуемом образце. Степень поглощения зависит от концентрации соответствующих частиц, что является основанием для количественного определения.

Средняя область ИК-спектра (часто упоминаемая как ИК-спектр) широко используется в анализе лекарственных веществ, наркотиков и пестицидов. *Дальняя ИК-область* необходима для анализа галогенированных соединений и неорганических веществ, поэтому некоторые приборы работают в диапазоне приблизительно от 5000 до 200 см^−1^. С помощью ИК-спектрометрии изучают главным образом молекулярные спектры, так как в ИК-области расположено большинство колебательных и вращательных спектров молекул. Поглощение ИК-излучения носит селективный характер и происходит на тех частотах, которые совпадают с некоторыми собственными частотами колебаний атомов в молекулах вещества и с частотами вращения молекул как целого, а в случае кристаллического вещества — с частотами колебаний кристаллической решетки. В результате интенсивность ИК-излучения на этих частотах резко падает — образуются полосы поглощения.

Каждое соединение имеет специфический ИК-спектр поглощения, отличающийся от ИК-спектра поглощения другого соединения. *При полном совпадении ИК-спектров поглощения* двух или нескольких веществ можно утверждать, что *данные объекты идентичны.* Соединение *в разных фазовых состояниях* имеют близкие, но *неодинаковые* ИК-спектры поглощения. *Тождественные ИК-спектры* принадлежат *оптическим изомерам одного и того же* соединения.

Как известно из курсов аналитической химии и общей физики, молекулы и ионы обладают несколькими видами энергии. Это поступательная, электронная, колебательная, вращательная энергия, каждая из которых характеризует определенное движение молекул, атомов или ядер атомов. Если амплитуда колебаний ядер одной из связей значительно превосходит амплитуды колебаний всех остальных ядер молекулы, тогда частоту данного нормального колебания условно относят к колебанию именно этой связи. Если частота, соответствующая колебанию определенной связи, мало меняется при переходе от одной молекулы, содержащей эту связь, к другой, то такую частоту называют *характеристической.* Наличие в колебательном спектре характеристических частот (полос) однозначно указывает на присутствие в молекуле вещества соответствующих им связей. Концепцию характеристических частот широко используют для проведения структурно-группового анализа веществ по их колебательным спектрам. Для подобного рода анализа неорганических и органических веществ существуют специальные корреляционные таблицы.

ИК-спектральный диапазон от 400–4000 см^ –1^ называют областью «отпечатков пальцев»Ранее областью «отпечатков пальцев» считали интервал 700–1500 см^−1^, в настоящее время в связи с прогрессом ИК-спектроскопии такой подход устарел.. Совокупность полос в этой области характеризует молекулу в целом.

Количественная зависимость между интенсивностью *I* прошедшего через вещество излучения, интенсивностью падающего излучения *I*~0~ и величинами, характеризующими поглощающее вещество, определяется законом Бугера–Ламберта–Бера (см. п. 5.4.2.1).

Если при колебаниях молекул *не происходит изменения дипольных моментов,* зарегистрировать их ИК-спектр нельзя. В этом случае информацию о молекуле можно получить *методом рамановской спектрометрии*, или *спектрометрии комбинационного рассеяния* (КРС). С помощью специальной техники удается зарегистрировать результат модуляции видимого света колебаниями молекул.

Таким образом, колебательные спектры регистрируют в форме ИК-спектров или спектров комбинационного рассеяния (спектров КР, рамановских спектров). ИК-спектр представляет собой спектр поглощения в инфракрасной области, спектр КР возникает при облучении вещества монохроматическим светом УВИ-диапазона.

При пропускании монохроматического светового потока (с частотой ν) молекулы вещества поляризуются и рассеивают свет с частотой ν (релеевское рассеяние) и частотами ν±ν~0~*i* (комбинационное рассеяние), где ν~0~*i* — частота нормальных колебаний молекулы. Колебательные частоты наблюдают в виде комбинационных смещений частоты возбуждающего света в УВИ области спектра.

Спектр КР строят в координатах: интенсивность рассеяния света — рамановское смещение. Энергия фотонов возбуждающего света *h*ν должна быть меньше энергии электронного возбуждения молекулы. В противном случае может возникнуть флуоресценция, перекрывающая спектр КР (рис. 5-23). Помимо полос с частотами ν±ν~0~*i*, называемых полосами первого порядка, в спектрах КР могут появляться полосы второго (ν±2ν~0~*i*), третьего (ν±3ν~0~*i*) и более высоких порядков.

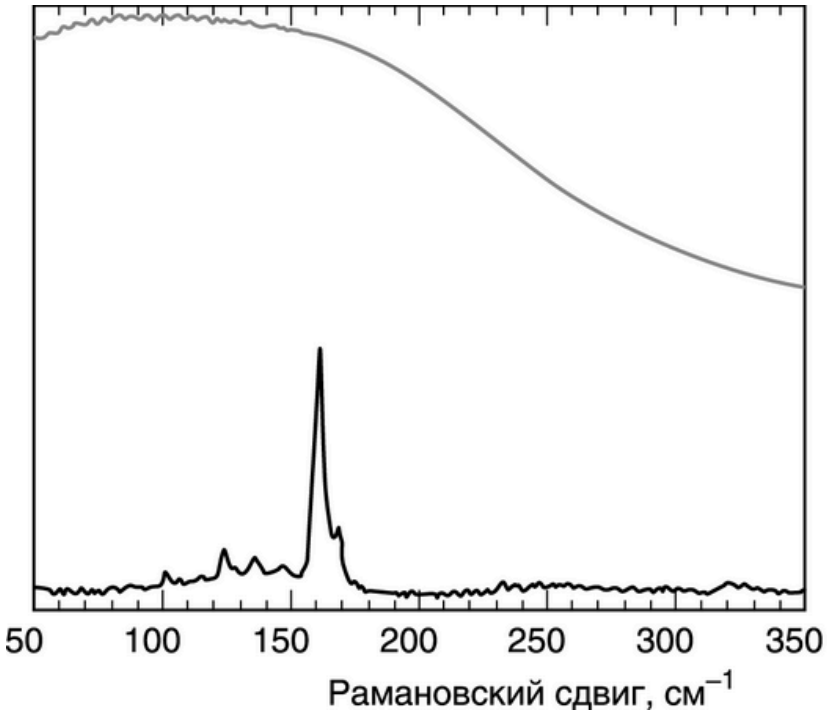


Рис. 5-23. Рамановский спектр героина в ультрафиолетовом диапазоне (возбуждение видимым светом дает сильную флуоресценцию)

Основные различия ИК- и КР-спектрометрии представлены в табл. 5-21.

Таблица 5-21. Основные различия ИК- и КР-спектрометрии

ИК-спектрометрия (ИКС)	**КР-спектрометрия (КРС)**
Интенсивность полосы тем больше, чем сильнее меняется дипольный момент молекулы при данном нормальном колебании	Интенсивные полосы присущи неполярным молекулам с ковалентными связями (например, H~2~, O~2~, C1~2~). Обязательное условие — поляризуемость молекулы
	Интенсивность антистоксовых полос заметно ниже, чем стоксовых (при обычной температуре)
Максимальная интенсивность полос поглощения у молекул с ионными связями	С повышением интенсивности возбуждающего монохроматического света интенсивность полос КР возрастает*
Дополняет возможности КРС. Полный набор колебательных частот молекулы может быть получен лишь на основе совместного анализа ИК-спектров и спектров КР	Дополняет возможности ИКС. Полный набор колебательных частот молекулы может быть получен лишь на основе совместного анализа ИК-спектров и спектров КР
Правило альтернативного запрета: для молекул, имеющих центр симметрии, колебания, асимметричные центру симметрии, активны в ИК-спектре и неактивны в спектре КР	Правило альтернативного запрета: для молекул, имеющих центр симметрии, колебания, симметричные центру симметрии, активны в спектре КР и не наблюдаются в ИК-спектре
	Интенсивность некоторых полос возрастает в тысячи (десятки тысяч) раз, если частота возбуждающего света ν приближается к частоте разрешенного электронного перехода молекулы (резонансное КР света)
Нельзя (не имеет смысла!) использовать для изучения водных растворов, поскольку вода интенсивно поглощает ИК-излучение	Следует применять для изучения водных растворов, поскольку комбинационное рассеяние воды весьма слабое

* Для того чтобы увеличить интенсивность линии рассеяния света, в качестве источника исходного монохроматического излучения используют лазеры.

КРС применяют для исследования молекулярной структуры органических и неорганических соединений, изучения водных растворов неорганических соединений, определения конфигурационных изомеров и в других случаях.

В табл. 5-22 приведены пределы обнаружения методов колебательной спектрометрии.

Таблица 5-22. Пределы обнаружения методов колебательной спектрометрии

Метод	**Предел обнаружения, масс. %**	**Агрегатное состояние образцов**
ИКС	10^–1^–10	Газы, жидкости, твердые вещества
РКС	10^–1^–10	Газы, жидкости, твердые вещества
Резонансная рамановская спектрометрия (РКР-спектрометрия)	10^–4^–10^–1^	Газы, жидкости

В ИК-спектрах и спектрах КР наряду с колебательными полосами по обе стороны от них присутствуют и полосы, отвечающие колебательно-вращательным переходам. По мере усложнения молекул веществ разрешение спектров уменьшается, и появляются широкие колебательно-вращательные полосыУ кристаллических солей спектры усложняются, что объясняется в каждом конкретном случае спецификой строения кристаллических решеток разных солей, искажением геометрии структуры вследствие несимметричных взаимодействий в кристалле и др. В этом случае говорят, что усложнение спектра обусловлено влиянием кристаллического состояния.. Сильное уширение полос в спектрах твердых и жидких веществ, а также их концентрированных растворов может быть связано с образованием водородных связей между полярными группами соседних молекул.

Рамановская спектрометрия нашла широкое применение *в криминалистической экспертизе* вследствие определенных особенностей.

Особенности Раман-спектрометрии:

* неразрушающий бесконтактный анализ; * высокая химическая селективность; * высокая чувствительность; * возможность микроскопического анализа; * возможность анализа различных объектов исследования (наркотики, взрывчатка, краска, волокна, чернила и др.); * возможность анализа вещества в запечатанной упаковке; * возможность автоматизированных измерений; * наличие стационарных и переносных приборов; * низкая мощность лазера; * быстрота измерений; * наличие тематических библиотек рамановских спектров.

На рис. 5-24 представлены спектры КР близких химических структур — морфина и героина.

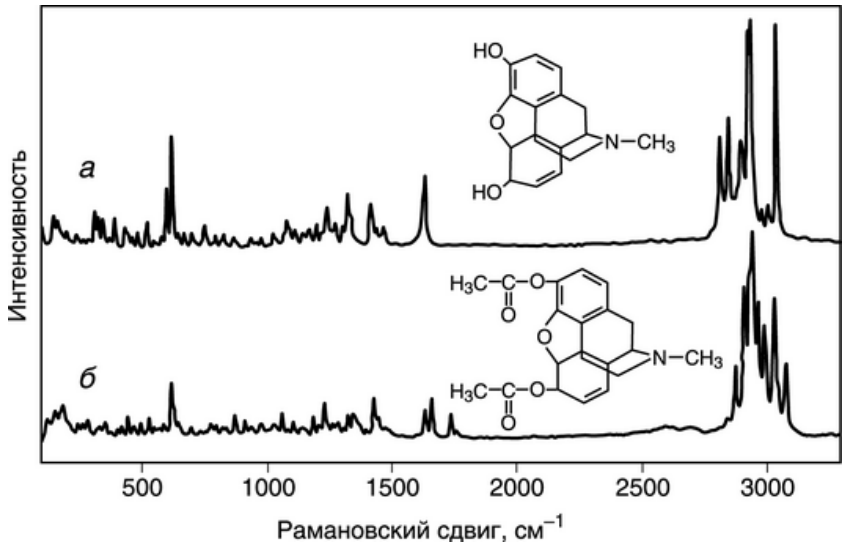


Рис. 5-24. Селективность рамановской спектроскопии

В криминалистике применяют *рамановскую микроскопию* для обнаружения и идентификации наркотиков, взрывчатых веществ, чернил и других вещественных доказательств. Используемые приборы имеют специальный микрозонд для лабораторных исследований и оптоволоконный датчик. Переносная рамановская система используется непосредственно на месте преступления. При этом можно быстро идентифицировать смеси наркотиков и их исходные компоненты по библиотеке спектров наркотических веществ (рис. 5-25).

За 10 с методом КРС можно установить следы взрывчатых веществ в образце или непосредственно на руках подозреваемого в их приготовлении и использовании субъекта, идентифицировать разнообразные черные (черные чернила представляют особую сложность) и цветные чернила, отличить одноцветные чернила друг от друга.

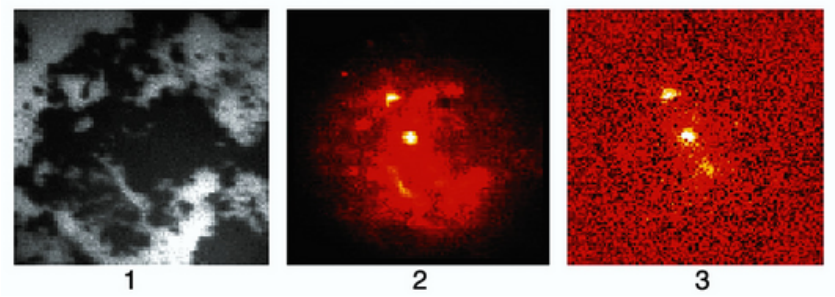


Рис. 5-25. Обнаружение наркотиков с помощью рамановской визуализации.

Смесь кокаина с сахаром: 1 — изображение в видимом свете; 2 — рамановская визуализация кокаина; 3 — рамановская визуализация кокаина (после вычитания фона)

ИК-Фурье-спектрометрия

ИК-Фурье-спектрометрия представляет собой один из вариантов метода ИК-спектрометрии и по существу *не является отдельным спектральным методом.* Спектры веществ, полученные на ИК-Фурье спектрометрах, не отличаются от спектров, полученных на диспергирующих ИК-спектрометрах. Термин «ИК-Фурье-спектрометрия» возник с появлением *нового поколения приборов*, в основе оптической схемы которых используются *интерферометры различного типа*.

Помимо стандартного использования ИК-спектрометрии для идентификации и количественного определения вещества, метод позволяет определять среднюю молекулярную массу некоторых полимеров по количеству концевых групп, степень стереорегулярности, конформационные изменения, наличие водородных связей, взаимодействие растворенное вещество–растворитель, природу гидратации и др. Для решения таких сложных задач используют более мощную аппаратуру, отличающуюся от традиционной, когда ИК-спектр регистрируют, например, записывая на бланке диаграммы в координатах пропускание T — волновое число $\tilde{\nu}$, в режиме пропускание — время сканирования. Это так называемый дисперсионный метод (см. ниже). Существенным недостатком таких систем становится их инерционность, обусловленная последовательной записью спектра по мере сканирования всего заданного участка ИК-области и инерционностью таких детекторов, как болометры и термопары. Устранить этот недостаток можно с помощью сочетания математического алгоритма *Фурье-преобразования с ИК-спектрометрией.*

ИК-Фурье-спектрометрия позволяет чрезвычайно быстро — за секунды — записать весь ИК-спектр (и в других областях спектра вплоть до радиочастотной!). Математический аппарат Фурье-преобразования дает возможность выделять исходные периодические компоненты из сложной также периодической функции, например записи ИК-спектра, разумеется, путем соответствующей компьютерной обработки. *Результатом Фурье-преобразования является частотный спектр.* В этом методе вместо традиционного монохроматора с выходной щелью используют классический интерферометр Майкельсона и пироэлектрические детекторы, что позволяет резко увеличить скорость съемки всего спектра до практически одномоментной. Интерферометр работает как своеобразный высокоскоростной прерыватель излучения, дающий соответствующую разность хода лучей. Благодаря этому два монохроматических потока с различающимися частотами, прошедшими через пробу, попадают в интерферометр одновременно и дают в зависимости от различия в пропускании соответствующую интерференционную картину, записываемую после выполнения Фурье-преобразования на компьютере как искомый ИК-спектр.

ИК-Фурье-спектрометрия обладает существенно бóльшим спектральным разрешением и отличается более низкими пределами обнаружения, так как вся энергия от ИК-излучателя проходит через образец (отсутствие оптических щелей в приборе) и попадает на детектор.

ИК-спектрометры и рамановские спектрометры

Спектрометры разделяют на *диспергирующие и недиспергирующие***.** К приборам первого типа относят сканирующие спектрометры, к приборам второго типа — *Фурье-спектрометры.* Сканирующие спектрометры построены на базе *монохроматора*, в Фурье-спектрометрах вместо монохроматоров применяют *интерферометры*.

Современные приборы, использующие Фурье-преобразование при получении и обработке данных, имеют значительные преимущества:

* упрощается контроль над работой прибора; * возрастают воспроизводимость и точность результатов; * возможен выбор наиболее удачного представления спектра (цифровая форма записи спектров позволяет оперировать с ними); * можно вычесть спектры растворителя и примесей из спектра исследуемого образца, который в этом случае будет выровнен, сглажен и преобразован в нужных координатах; * можно значительно расширить масштаб поглощения; * можно многократно снять спектр слабопоглощающего образца, что усреднит сигнал, заметно уменьшит влияние шума и увеличит чувствительность; * спектр образца легко сравнить с библиотекой спектров благодаря цифровой обработке; * можно вывести на экран монитора или распечатать список наиболее близких к исследуемому образцу веществ либо зарегистрировать наличие в нем функциональных групп.

Рамановская приставка (например, SynergyTM) к Фурье-спектрометрам (ближний ИК-лазер) позволяет получать рамановские спектры без влияния флуоресценции. Переносной рамановский спектрометр, имеющий диодный лазер и электроохлаждаемый матричный CCD-детектор, разрешение 15 см^–1^ и спектральный диапазон 2700–200 см^ –1^, позволяет работать в полевых условиях.

Использование математического алгоритма Фурье-преобразования имеет большие преимущества (табл. 5-23).

Таблица 5-23. Преимущества использования математического алгоритма Фурье-преобразования в методах инфракрасной спектрометрии и резонансной рамановской спектрометрии

ИК-Фурье-спектрометрия	**Раман-Фурье-спектрометрия**
Высокая чувствительность: рекордное по сравнению с обычными ИК-спектрометрами отношение сигнал / шум позволяет в несколько раз повысить чувствительность	Можно анализировать образцы любой природы, в том числе полиморфы, в нанограммовых количествах: одиночные кристаллы, жидкие глины, кремы, водные и органические растворы, масла, образцы газовой фазы, процедурные потоки и др.
Высокая производительность: время получения спектра при средних требованиях к разрешению и фотометрической точности не превышает 15–20 с	По своей природе недеструктивный метод
Достоверность анализа: идентификация осуществляется автоматически с использованием библиотеки стандартных спектров, включенной в базу спектрометра. Практически исключается возможность субъективной ошибки оператора	Простота методики анализа: * твердые образцы не прессуют в диски KBr, а помещают в облицованные золотом или стеклом держатели и облучают лазером; * жидкие образцы анализируют в кварцевых или стеклянных кюветах, которые могут иметь зеркальную заднюю поверхность для увеличения интенсивности сигнала; * многие образцы (жидкие и твердые) могут быть проанализированы в стеклянной посуде, хотя опасность возникновения флуоресценции достаточна высокая; * образцы аморфной природы и из материала темного цвета, поглощающие много тепла при действии лазера и деградирующие, анализируют с помощью специальных устройств и фильтров

Автоматизация измерений: процесс получения спектра и его обработка полностью автоматизированы; результаты измерений автоматически протоколируются и заносятся в базу данных; спектрометр может комплектоваться автоматической многопозиционной кассетой для образцов, управление которой осуществляется от компьютера и может программироваться оператором	Вода является лучшим растворителем для изучения КР-спектра, поскольку Раман-спектр воды имеет одну широкую полосу слабой интенсивности при 3500 см ^—1^

Подготовка образцов для исследования методом ИК-спектрометрии

Для исследования вещества методом ИК-спектрометрии очень важно иметь чистые образцы. ИК-Фурье-спектрометры позволяют проводить судебно-химические, криминалистические и другие исследования биопроб, материалов, веществ и изделий на новом качественном уровне. Эффективно использовать оборудование для ИК-Фурье-спектрометрии можно только при соответствующей подготовке пробы, предназначенной для анализа.

При работе на ИК-Фурье-спектрометрах можно применять как традиционные способы пробоподготовки вещества для ИК-спектроскопии, так и некоторые новые приемы (с помощью дополнительных приставок), позволяющие использовать меньшие пробы. Главная сложность заключается в очистке и обработке нескольких микрограммов пробы без потерь. В настоящее время эта проблема решается относительно легко при использовании газового (или жидкостного) хроматографа, соединенного с ИК-Фурье-спектрометром.

Для очистки биопробы используют любой вид хроматографии в зависимости от поставленных задач и условий работы лаборатории.

Наиболее трудоемкий способ очистки — это *бумажная* или *тонкослойная хроматография*. Существуют значительные ограничения и меры предосторожности при этих способах очистки. Предъявляются особые требования к адсорбенту (чистота), элюенту (количество менее чем I мл; чистота), количеству образца, детектирующим агентам (не разрушающие структуру определяемого вещества), условиям выполнения процедур (избегать контакта образцов с пластмассами, особое мытье посуды и др.). Для каждого вещества оптимальную хроматографическую систему и элюирующий растворитель можно подобрать только опытным путем. Использование водных растворов кислот или щелочей для элюирования веществ с пластинок или бумажных хроматограмм и последующее извлечение из водного раствора более эффективны, чем прямое извлечение с адсорбента. Каждый способ очистки образцов с помощью бумажной или тонкослойной хроматографии имеет свои преимущества и недостатки, поэтому эксперт принимает решение, исходя из конкретной ситуации.

Очистка образцов с помощью *ГХ* способствует получению чистых образцов для ИК-спектрометрии. Регистрируют спектр пара, выходящего из хроматографа, или выделяют вещество и записывают его спектр. Методика позволяет получить надежные результаты для летучих соединений. Используют различные способы перевода вещества из газового хроматографа в форме, наиболее пригодной для получения ИК-спектра. Например, барбитураты и фенотиазины удается регенерировать на 50% в стеклянных или металлических капиллярных трубках, выдерживаемых при комнатной температуре, более летучие вещества (амфетамины) предварительно охлаждают жидким азотом. Микрокюветы вместимостью 2–0,2 мл и толщиной стенки 0,1–0,01 мм, изготовленные из хлорида серебра и называемые внешними кюветами, особым образом соединяют с выходным отверстием газового хроматографа. Кюветы можно использовать при комнатной температуре, охладить в замораживающих смесях или в жидком азоте. Их можно использовать многократно при хранении в темном месте.

Хорошие результаты получают при работе с мембранными фильтрами на основе эфиров целлюлозы.

Для твердых при комнатной температуре веществ пригодна следующая методика. Прямую трубку, набитую порошком галогенида щелочного металла, соединяют с выходным отверстием хроматографа. Поток выходит из хроматографа и конденсируется на порошке, который после этого сжимают в диск. Главная трудность, общая

для всех способов сбора фракций, заключается в определении оптимальной температуры выходной трубки хроматографа и температуры собирающего устройства.

ВЭЖХ является наиболее удобным методом очистки, особенно в тех случаях, когда неприемлема ГХ или требуется дериватизация пробы. В отличие от газовых жидкостные хроматографы обычно работают при температуре, близкой к комнатной, а большинство используемых детекторов неразрушающие. Можно собрать соответствующую фракцию элюата, держа тест-трубку перед выходным отверстием. Во многих случаях количество образца слишком мало, чтобы использовать стандартные кюветы, поэтому применяют микрокюветы типа внешних. Вещество регенерируют, выпаривая растворитель. Однако выпаривание приводит к концентрированию всех нелетучих примесей в растворителе, поэтому очень важно применять особо чистый растворитель.

Довольно часто используют *технику микросублимации*. Вещество сублимируют из выпаренного растворимого экстракта в трубке на охлажденном штифте прибора, далее сублимат осторожно растирают с порошком бромида калия и снимают спектр.

ИК-спектры можно снять в газовой, жидкой и твердой фазах, но большинство веществ, интересующих токсикологов, при комнатной температуре твердые.

Способы подготовки проб, не требующие предварительного разделения на компоненты:

* прессование таблеток с галогенидами щелочных металлов; * суспензионный способ; * получение пленок; * использование устройства для исследования веществ в жидком и газообразном состоянии.

Такие способы часто используются в различных областях экспертной практики (криминалистической, экологической, судебно-химической и др.).

Методы нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) и многократно нарушенного полного внутреннего отражения (МНПВО)

Все идеи в науке родились
в драматическом конфликте
между реальностью и нашими
попытками ее понять.

Альберт Эйнштейн (1879–1955), академик,
физик-теоретик, один из основателей современной
теоретической физики, создатель теории
относительности, почетный член АН СССР (1926),
лауреат Нобелевской премии по физике (1921)

Эти методы широко применяются для исследования многослойных сильнопоглощающих и сильно рассеивающих объектов, тонких пленок, поверхностных слоев, в том числе мономолекулярных слоев, водных растворов, лекарственных препаратов, при изучении состояния веществ вблизи границы раздела фаз (электрод–раствор) и др. В таких случаях получение ИК-спектров традиционными способами затруднительно или невозможно. Методами НПВО и МНПВО можно работать и в УВИ-области спектра. Это неразрушающие методы исследования.

В основе этих методов лежат закономерности отражения электромагнитных излучений от различных сред. Спектры отражения получают, как правило, в оптической (ИК, УФ и видимой) области с помощью спектрофотометров, снабженных специальными устройствами.

Спектры внешнего и внутреннего отражения

Спектры внешнего отражения, в свою очередь, делятся на спектры:

* зеркального отражения, когда падающий и отраженный лучи лежат в одной плоскости с нормалью к отражающей поверхности, а угол отражения равен углу падения; * спектры диффузного отражения, когда отраженные лучи рассеиваются в разных направлениях.

Характер внешнего отражения излучения определяется соотношением между длиной волны λ падающего излучения и размерами неровностей отражающей поверхности. При неровностях, размеры которых меньше λ, наблюдается зеркальное отражение, в остальных случаях — диффузное отражение (рассеянное излучение). Практически отраженное излучение имеет смешанный характер; при специально выбранных условиях преобладает вклад того или иного вида отражения. Зеркальное отражение получают с помощью гладкой плоской поверхности, в частности при исследовании молекулярных структур слоев, нанесенных на различные подложки. Зная оптические постоянные вещества, в спектрах отражения можно выделить смещение и искажение форм спектральных полос и изменение их интенсивности, вызванные не оптическими эффектами, а изменениями структуры отражающей поверхности или химическими реакциями. Обычно при внешнем отражении падающий луч проникает в образец на глубину 10–20 мкм. С использованием *ИК-Фурье-спектрометров* могут быть исследованы *слои толщиной от 5 до 500 мкм при площади исследуемого образца до 1 мм^2^ за время от 2 до 30 мин.*

Спектры, полученные при зеркальном отражении, представляют собой суперпозицию спектров отражения и пропускания. Обычно наилучшие результаты получают при угле падения излучения около 45° и толщине покрытий 0,01 мм. Количество отраженной энергии при скользящем падении луча может быть значительно больше, причем проникновение излучения будет более глубоким, т. е. будет исследоваться бóльшая толщина образца.

Спектры диффузного отражения обычно малоинтенсивны, так как удается собрать и направить в спектральный прибор только очень небольшую часть рассеянного (отраженного) излучения. Поэтому в этом случае необходимо применять ИК-Фурье-спектрометры, обладающие высокими светосилой и соотношением сигнал– шум. Получаемые при диффузном отражении спектры часто подобны спектрам пропускания. Исследуемыми образцами могут быть массивные твердые тела, порошки (иногда содержащие наполнители — KBr, KCl, CsI, прозрачные в исследуемой области спектра), волокнистые (ткани, войлок) и ячеистые материалы, пены, суспензии и аэрозоли. Спектры отражения при диффузном рассеянии могут наблюдаться от достаточно малых количеств вещества, например от пятен на хроматографической пластине.

Спектры полного внутреннего отражения наблюдают, если при отражении светового луча его интенсивность и спектральный состав не изменяются. Если излучение проходит сначала через призму и ее границу с образцом под углом, превышающим критический, а затем проникает в образец (на глубину 1–2 мкм), где теряет часть своей энергии и отражается, то спектральный состав отраженного света будет отличаться от спектрального состава падающего светового луча, а его интенсивность уменьшится. Это явление называют **НПВО**. Регистрируя на спектрофотометре интенсивность отраженного излучения в определенном спектральном диапазоне (в ИК- или УВИ-области спектра), можно получить спектр поглощения тонкого приповерхностного слоя оптически менее плотной среды — *спектр НПВО*. В качестве материала для призм используют прозрачные в различных областях спектра кварц, оксиды цинка и магния, сапфир, кремний, фторид кальция, сульфид мышьяка, германий, селениды мышьяка и цинка, хлориды натрия, калия и серебра, бромиды калия и серебра, теллурид кадмия, алмаз. *При интерпретации спектров НПВО* следует иметь в виду, что интенсивность полос повышается по мере увеличения длины волны, что обусловлено более глубоким проникновением в образец длинноволнового излучения. Кроме того, искажения формы полос и их смещения может быть обусловлены дисперсией показателя преломления.

Часто используют методику получения спектров **МНПВО**, причем число отражений может быть 25 и более. *При МНПВО интенсивность* полос поглощения в получаемом спектре *многократно увеличивается* по сравнению с *НПВО;* сами спектры получаются более четкими.

Длина призмы, находящейся в контакте с исследуемым образцом, может превышать 50 мм при толщине до 2 мм. Угол падения излучения на кристалл можно варьировать, при этом изменяются число отражений и, соответственно, интенсивность спектра МНПВО. Чем выше показатель преломления материала призмы, тем меньше глубина проникновения излучения в образец. Метод МНПВО особенно полезен для качественного анализа и успешно применяется для исследования поверхностей твердых тел и жидких образцов — водных растворов (объемом до 25 мкл), вязких и клейких веществ, паст, поверхностных покрытий, поверхностей полимерных соединений, волокнистых и вспененных материалов и т.д. Качество получаемых спектров МНПВО сильно зависит от контакта между кристаллической призмой и образцом. Вследствие мягкости или хрупкости материалов призм, используемых в этом методе, исследуемые твердые образцы должны иметь гладкую плоскую поверхность и не должны быть чрезмерно жесткими или шероховатыми.

ИК-Фурье-спектрометры *в сочетании с приставкой НПВО (МНПВО)* представляют собой эффективный аналитический инструмент исследования химического состава жидких сред, в том числе водных растворов, а также мелкодисперсных порошков и *полимерных* пленок. Толщина поглощающего слоя в зависимости от материала и параметров призмы может быть выбрана в пределах 1–50 мкм. Спектрометрия МНПВО, являясь аналогом абсорбционной спектрометрии, позволяет существенно упростить подготовку образцов и может использоваться *для реализации экспресс-методик образцов.*

В приставках НПВО и МНПВО в качестве оптически более плотных сред применяют различные прозрачные материалы с высокими показателями преломления KRS — 3, KRS — 5, KRS — 6, жидкостные оптические элементы, например иодистый метилен (CH~2~I~2~), и др. На границе раздела фаз образца и оптического материала (KRS-5, KRS-6 — монокристалла галогенидов таллия или селенида цинка) возникает затухающая волна ИК-излучения, которая проникает на некоторую глубину в оптически менее плотную среду (образец), при этом регистрируется спектр пропускания ультратонких верхних слоев образца. Меняя угол падения ИК-излучения, можно последовательно получать спектры более глубоколежащих слоев при исследовании многослойных пленочных материалов, порошков, жидкостей, прозрачных и непрозрачных пленок (размер пленки не менее 0,5 см^2^) с использованием приставки МНПВО, которая прилагается к ИК-Фурье-спектрометру и устанавливается в кюветное отделение прибора. Спектр пробы, полученный методом МНПВО, совпадает со спектром пропускания вещества, полученным при обычных способах пробоподготовки (например, в таблетке с KBr), по наличию, форме и относительной интенсивности полос поглощения. Поэтому по МНПВО-спектрам идентификацию вещества можно проводить обычным способом с помощью библиотек ИК-спектров веществ в конденсированном состоянии.

Ниже указаны преимущества метода МНПВО.

* Простота пробоподготовки. Исследуемый образец (жидкость, мелкодисперсный порошок) достаточно поместить в ванночку, дно которой образовано призмой МНПВО. Полимерные образцы механически прижимают к поверхности призмы. * Высокая воспроизводимость. Эффективная толщина поглощающего слоя воспроизводится с высокой точностью, в отличие от толщины оптических кювет, так как определяется только материалом и параметрами призмы МНПВО и коэффициентом преломления исследуемого вещества. * Простота обслуживания. Приспособления МНПВО в процессе подготовки и измерений не требуют сборки-разборки, не содержат труднодоступных полостей, которые могли бы затруднять промывку. * Высокая производительность. Время получения спектра, включая помещение образца, при стандартных требованиях к разрешению и фотометрической точности не превышает 1–2 мин.

Спектры отражения — единственный метод получения количественных оптических характеристик веществ, для которых по тем или иным причинам (очень сильное поглощение, невозможность получить тонкие слои и т. п.) *не могут быть получены* спектры пропускания.

ИК-Фурье-микроскопы

ИК-Фурье-микроскопы являются приставкой к Фурье-спектрометрам и предназначены для получения ИК-спектров пропускания и отражения для области исследования размером 300 мкм и менее. Микроскопы оснащены двумя детекторами (точечными, матричными до 128×128 пикселей, для средней или ближней ИК-области и др.), видеокамерой, НПВО-объективами и другими приспособлениями и приставками. Оборудование позволяет проводить исследования микрообразцов и микрообластей в неоднородных образцах. ИК-микроскоп устанавливают в кюветном отделении Фурье-спектрометра или в квазипараллельном пучке ИК-излучения, выводимого за пределы ИК-Фурье-спектрометра.

Преимущества ИК-микроскопов при получении и анализе инфракрасного изображения:

* возможность работы с микро- и макрообразцами; * наличие объектива со скользящим углом; * автоматическое фокусирование в видимой и ИК-областях; * возможность исследования крупных объектов; * возможность видеть одновременно как всю площадь образца, так и исследуемый фрагмент; * возможность наблюдать объекты как через бинокуляры, так и на экране компьютера через видеокамеру; * возможность с помощью посадочного места на один или два детектора устанавливать одновременно либо два точечных детектора, либо точечный и матричный детекторы; * возможность с помощью масштабирования в видимой и ИФ-областях получать при необходимости

более высокое увеличение без смены объективов; * возможность запуска регистрации спектров прямо с панели управления микроскопа; * одновременная реализация автофокуса для ИК- и видимой областей, что обеспечивает полное соответствие между видимым изображением объекта и получаемыми с него ИК-спектрами; * возможность с помощью автоматического многоточечного анализа независимо анализировать одновременно множество образцов, помещенных на столик микроскопа, или множество точек на одном образце.

Особенности способов идентификации ИК-спектра

Выбор способа идентификации вещества по ИК-спектру будет в значительной степени зависеть от того, какая уже имеется информация о веществе, например значение *R*~f~, результаты цветных реакций и др. Когда предполагают, что ИК-спектр определяемого вещества идентичен найденному библиотечному спектру, то *следует сравнить полученный спектр со спектром стандартного образца.* Эта процедура подтвердит или опровергнет предварительную идентификацию. Если эти два спектра были зарегистрированы в одинаковых условиях и на приборах одного типа, они будут очень схожи. Если спектры были зарегистрированы на разных приборах, они будут отличаться друг от друга. В этом случае следует очень тщательно сравнить относительную интенсивность и частоту полос.

Пример (данные авторовИсследования проводились в Экспертно-криминалистическом центре МВД на ИК-Фурье-спектрометрах экспертами В. И. Сорокиным, Е. А. Симоновым и др.). В начале 1998 г. в Москве и Московской области появилось новое, ранее не встречавшееся в незаконном обороте в России наркотическое средство этонитазен. Этонитазен [1-(2-диэтиламиноэтил)-2-*п*-этоксибензил-5-нитробензимидазол] — брутто-формула C~22~H~28~N~4~O~3~, молекулярная масса 396,5 а. е. м., температура плавления хлороводородной соли 162–164 °С.

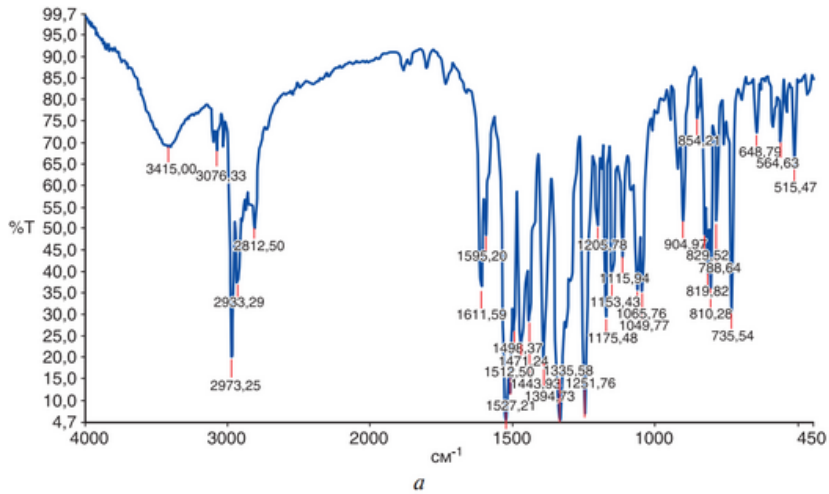
Этонитазен — «наркотик войны» — повсеместно использовался нацбатальонами Украины в ходе боевых действий при проведении РФ СВО 2022 г.

Согласно данным литературы, этонитазен по анальгезирующему действию превосходит морфин в 1000–1500 раз; наркотическое средство галюциногенного действия, одно из самых распространенных в настоящее время синтетических наркотических средств (см. гл. 6).

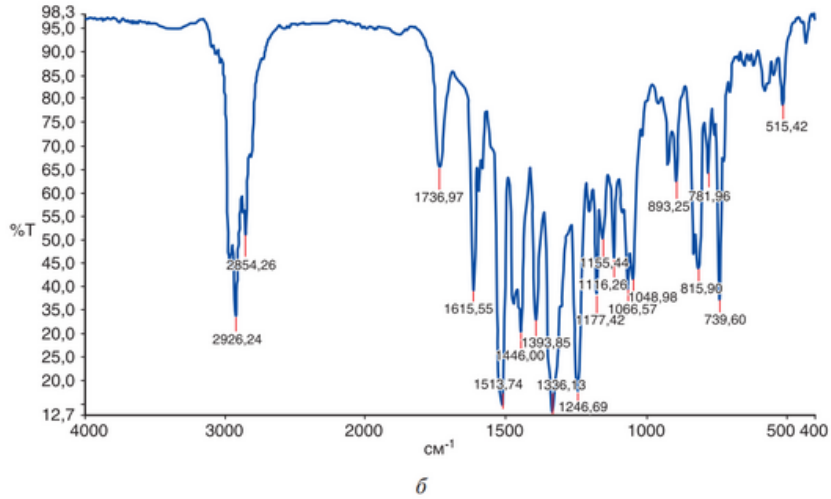
Изъятые образцы — порошкообразные вещества белого и светло-желтого цвета. В состав порошков в качестве наполнителей входили тальк и сахароза. Основная задача подготовки пробы к исследованию методом ИК-спектрометрии состояла в выделении активного компонента.

Методика. Навеску объекта массой около 10 мг помещают в склянку, добавляют 1 мл дистиллированной воды, каплю 25% водного раствора аммиака, 1 мл хлороформа (или четыреххлористого углерода), осторожно встряхивают, а затем центрифугируют (особенно при наличии талька). Органический экстракт (нижний слой) аккуратно переносят в агатовую ступку и выпаривают в сушильном шкафу при 50–60 °С до сухого остатка, который исследуют методом ИК-спектрометрии.

ИК-спектр образца этонитазена сравнивали с библиотечным ИК-спектром этонитазена (рис. 5-26).



а



б

Рис. 5-26. ИК-спектр этонитазена основания из библиотеки Crime (фирма Perkin Elmer, США) (*а*); ИК-спектр экстракта образца этонитазена, содержащего сахарозу и тальк в качестве наполнителя (*б*)

Если ИК-спектр не соответствует ни одному из имеющихся в банке данных, но известно, к какой группе веществ относится определяемое соединение, то его спектр можно найти в соответствующих собраниях (атласах) спектров.

ИК-спектр определенного вещества находят *в атласах спектров по шести основным полосам поглощения.* Это составляет основу системы идентификации.

Во многих случаях ИК-спектр в атласе представлен в сокращенном виде. Отобранные пики наиболее интенсивны (за исключением пиков в области 1490–1320 см^ –1^) и собраны в порядке уменьшения их амплитуды. Однако из-за различия условий записи и используемых приборов при воспроизведении (при последующих определениях) можно не получить пики такой же интенсивности.

В ИК-спектрах иногда регистрируют так называемые фальсифицированные полосы поглощения, возникающие по разным причинам: например, биоматериал был подвергнут нескольким разным способам очистки. Следы пластификаторов, сурфактантов и масел на стеклянной посуде могут также стать причиной возникновения фальсифицированных полос (табл. 5-24).

Заключительной стадией процесса идентификации в идеале должна быть стадия сравнения спектра неизвестного вещества со спектром чистого вещества, полученного, насколько это возможно, при тех же или идентичных условиях и на том же приборе. Это особенно важно, если соответствие спектра определяется автоматически. Компьютер может выделить из библиотеки только те спектры, которые заложены в его память. Если спектра найденного вещества в библиотеке нет, то компьютер подберет спектры наиболее близких по структуре веществ. Особого внимания требует идентификация спектров твердых веществ, обладающих полиморфизмом.

Таблица 5-24. Частоты фальсифицированных полос поглощения

Частота, см^–1^	**Источник**	**Причина возникновения полос**
3800–2500	H~2~O	Свободная или связанная вода в молекуле может увеличить четкость и ширину пика. При работе с дисками KBr пик связанной воды может появиться при 3350 см^ —1^
3300–3000	NH~4~^+^	Оптическое наложение
1810–1600	C=O	Примеси веществ, молекулы которых содержат карбонильную группу, например фосген в хлороформе, пластификаторы
1750–1500	H~2~O	Свободная или связанная вода в молекуле может увеличить четкость и ширину пика
1610–1515	–COO^ —^	Ацетаты щелочных металлов (у которых также есть слабая полоса поглощения при 1425 см^ —1^)
1400	NH~4~^+^	Оптическое наложение
1265	Si—CH~3~	Смазка запорного устройства или силиконовое масло

1110–1050	Si—O—Si	Стеклянные посуда или гидролизуемые кремниевые соединения
730–720	Полиэтилен	Полиэтиленовая лабораторная посуда
700	Полистирол	Полистирольная лабораторная посуда

КРС и ИКС используют для изучения *природы полиморфа.*

Полиморфизм *(способность молекулы кристаллизоваться в различные трехмерные структуры)* характерен для многих веществ. Термин «полиморф» включает в себя полиморфы, псведополиморфы, гидраты, сольваты и его обычно используют для характеристики соединения как совокупности разных кристаллических структур, которые сосуществуют как единое целое. Полиморфизм приобретает особое значение при определении качества лекарственных препаратов, контроле их производства, изучении механизма токсичности веществ.

КР-спектрометрия может быть использована для изучения природы полиморфа и особенно полезна в случаях, когда невозможна полная кристаллографическая характеристика вещества. Дополнительное преимущество Раман-спектрометрии в подобных исследованиях — простота методики и возможность измерения низкочастотных колебаний (500–50 см^–1^). Часто спектры двух твердых веществ различаются в низкочастотной области рамановского спектра. Метод Фурье–Раман-спектрометрии позволяет без разрушения и разделения образца идентифицировать лекарственные формы, содержащие смесь полиморфов, определять в них примеси и наполнители.

Полиморфные вещества могут давать различные не только КР-, но и ИК-спектры. Например, полиморфизм характерен для барбитуратов. Спектральные различия между полиморфами связаны с образованием различных внутримолекулярных и межмолекулярных водородных связей.

5.4.3. Атомная спектрометрия в элементном анализе токсикантов. Применение комбинированных систем: ВЭЖХ-ИСП-МС, ГЖХ-ИСП-МС, КЭ-ИСП-МС

О, сколько нам открытий чудных
Готовят просвещенья дух,
И опыт, сын ошибок трудных,
И гений, парадоксов друг,
И случай, бог изобретатель.

Александр Сергеевич Пушкин (1799–1837),
величайший русский поэт,
«солнце русской поэзии»,
основоположник современного русского
литературного языка, прозаик,
драматург, историк,
публицист, «наше всё»

В клинико-токсикологических, судебно-химических, криминалистических, эколого-токсикологических, клинических и других лабораториях часто возникает необходимость определения элементного состава отдельных биообразцов и/ или элементного статуса пациента.

Физико-химические методы элементного анализа имеют принципиально более низкие пределы обнаружения и несравненно более эффективны, чем классические химические методы анализа. Избыточная (с точки зрения химика-аналитика) информационная мощь таких методов, как оптическая эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (**ИСП-ОЭС**), или плазменная атомно-эмиссионная спектрометрия (**ИСП-АЭС**), и МС с индуктивно связанной плазмой (**ИСП-МС**), имеет огромное преимущество в экспертной практике, токсикологии, медицинской элементологии и экологии при выполнении сравнительных определений большого числа элементов (см. ниже и п. 7.5).

Метод ААС. Традиционным стандартным методом определения элементов в биологических объектах является ААС. Достигаемые пределы обнаружения, особенно в методе ААС с электротермической атомизацией (**ЭТААС**),

например при использовании графитовой кюветы, оказываются вполне удовлетворительными. *Характеристический источник света* (линейчатого спектра определяемого элемента) — лампа полого катода или газоразрядная безэлектродная лампа. Спектрометр-монохроматор служит для выделения в спектре определенных длин волн и проведения измерений. Детектором служит фотоэлектронный умножитель или полупроводниковый чип, который преобразует световую энергию определенной длины волны в пропорциональный электрический сигнал. Жидкий образец при помощи распылителя превращается в мельчайшие капли аэрозоля. Затем этот аэрозоль вводится в высокотемпературное пламя горелки. Атомы или ионы интересующего элемента поглощают световую энергию лампы на определенной резонансной длине волны. Уменьшение интенсивности резонансного излучения подчиняется экспоненциальному закону убывания интенсивности в зависимости от длины слоя и концентрации вещества, аналогичному закону Бугера–Ламберта–Бера. Концентрационная зависимость выражается уравненением

lg*I*~0~ / *I* = *A* = *kcl*,

где *k* — коэффициент поглощения; *c* — концентрация; *l* — толщина слоя (пламени).

При количественном определении методом ААС обычно применяют способ градуировочного графика или способ добавок. Способ градуировочного графика предусматривает измерение оптической плотности нескольких стандартных растворов и построение графика в координатах оптическая плотность — концентрация. Затем определяют оптическую плотность анализируемонго раствора и по графику находят его концентрацию.

При использовании способа добавок сначала измеряют оптическую плотность анализируемого раствора, затем вводят в него определенный объем стандартного раствора и снова определяют оптическую плотность. Концентрацию анализируемого вещества находят по формуле

C~*x*~ = *C*~ст~ · *A*~*x* ~/ *A*~*x*~~+ ст~ – *A*~*x*~.

Пламенная ААС получила широкое распространение вследствие многих преимуществ. Важным условием является малое число линий в спектре, поэтому наложения аналитических линий практически не происходит. Предел обнаружения для многих элементов характеризуется величиной 10^–5^–10^–6^%. Погрешность определения обычно составляет 5% и может изменяться в пределах 3–10%. Однако этим методом не определяются элементы, резонансные линии которых лежат в далекой УФ-области спектра (C, P, галогены и др.). К недостаткам метода относятся ограниченная производительность, определяемая наличием источников резонансного излучения, перечень определяемых элементов, невозможность одновременного определения нескольких элементов, необходимость полной деструкции матрицы. При этом чувствительность определения легколетучих элементов, например ртути, реализуется только с помощью соответствующих гидридных приставок (метод холодного пара). Тем не менее преимущества метода и доступность соответствующей техники позволяют отнести его к стандартным (табл. 5-25). Умеренные пределы обнаружения метода пламенной ААС ограничивают его применение и делают пригодным для определения элементов, находящихся в биообразцах на уровне, составляющем миллионные доли единицы (1 ppm = 10^–4^% = 1 мг / л): Na, Ca, Mg, Cu, Zn.

Большинство анализов методом АСС выполняется в атомизаторах пламени. Образец в жидком виде вводится в пламя, где в ходе химических реакций разрушается любое органическое вещество образца, а неорганическое разлагается на свободные атомы. В настоящее время нашли широкое применение приборы, имеющие атомизаторы с графитовым стержнем.

Таблица 5-25. Преимущества и недостатки пламенной атомно-абсорбционной спектрометрии

Преимущества	**Недостатки**
Предел обнаружения ряда элементов 10^–5^–10^–6%^. Погрешность в зависимости от условий определения 3–10%. Высокая элементная селективность. Простота выполнения	Невозможность многоэлементного анализа. Не определяются C, P, галогены и др. Короткий линейный диапазон калибровки (не более трех порядков). Помехи при анализе: химические (влияние PO~4~^3–^ на Ca), нежелательная ионизация (Na, K, Ba, Al).

	Для каждого элемента требуется соответствующая лампа. На измерение одного элемента требуется 3–5 мл раствора образца. Пределы обнаружения метода недостаточны для определения многих элементов на нормальном биологическом уровне в клинических образцах

Метод ЭТААС. При использовании этого метода образец объемом в несколько микролитров наносится на подложку графитовой кюветы.

Для разложения образца используют электрическое нагревание, которое происходит в три стадии: сушки, озоления и атомизации. На стадии сушки растворитель выпаривается при низкой температуре, затем при более сильном нагревании из образца удаляются летучие компоненты и остаток из нелетучих неорганических соединений атомизируется при еще более интенсивном нагревании. Излучение, поглощенное атомами на стадии атомизации, измеряется. Концентрацию определяют по высоте пика поглощения. Атомизатор дает возможность измерять очень малые концентрации веществ и вязкие образцы.

Пределы обнаружения на уровне первых долей на миллиард (1 ppb = 10^–7^% = 1 мкг / л), малые объемы образца (микролитры) и способность напрямую анализировать твердые образцы делают метод ЭТААС пригодным для различных целей исследования (табл. 5-26). Например, метод ЭТААС часто используют для определения свинца в крови (см. п. 7.5).

ИСП-АЭС. Высокоэффективным методом определения микроэлементов в биологических объектах является ИСП-АЭС (ИСП-ОЭС), или плазменная атомно-эмиссионная спектрометрия.

Таблица 5-26. Преимущества и недостатки атомно-абсорбционная спектрометрия с электротермической атомизацией

Преимущества	**Недостатки**
Чувствительность по разным элементам на 2–3 порядка выше, чем в пламенной ААС	Короткий линейный калибровочный диапазон
Для анализа достаточны микролитровые объемы образца	Помехи: фоновая абсорбция; эффект памяти; необходимость применения химических модификаторов матрицы
Умеренная стоимость анализа	Весьма медленный анализ, до 3 мин на одну реплику для одного элемента
Анализ твердых образцов без растворения. Возможность использования различных биообъектов (волосы, ногти и др.)	–
Пределы обнаружения достаточны для определения большинства из обычно вызывающих интерес элементов в биообразцах при нормальном уровне содержания	–

В ИСП-ОЭС-приборе тонко диспергированный аэрозоль образца в токе аргона вводится в факел высокотемпературной аргоновой плазмы (6000–10 000 K). Высокая температура аргоновой плазмы, поддерживаемая за счет ее индуктивного разогрева, позволяет избежать длительной процедуры полной минерализации матрицы и провести высокочувствительный многоэлементный анализ. Пределы обнаружения большинства металлов оказываются достаточно низкими, однако проявление спектральных наложений осложняет работу. Конструктивно спектрометры для ИСП-АЭС могут быть представлены в параллельном и последовательном вариантах. В *параллельных* спектрометрах суммарное излучение разлагается в спектр, после чего соответствующие спектральные линии определяемых элементов единовременно регистрируются многоэлементным детектором, например диодной матрицей. Таким образом, перечень определяемых элементов жестко предопределен конструкцией прибора. В *последовательном (сканирующем)* спектрометре определяется интенсивность спектральных линий всех интересующих исследователя элементов, информация о которых заранее

вводится в рабочую программу прибора. Производительность современных сканирующих приборов с высоким оптическим разрешением хорошо сочетается с их аналитической возможностью одномоментно определять до 70 элементов в пробе. Несмотря на высокую стоимость ИСП-спектрометров, наиболее надежные данные о содержании химических элементов (металлов) в живых организмах в последнее время были получены именно с помощью ИСП-АЭС.

Поскольку резонансные линии неметаллов часто лежат в экспериментально труднодоступной вакуумной УФ-области, пределы обнаружения, например мышьяка, селена и других элементов, в этом методе оказываются не всегда удовлетворительными для целей биомедицинских исследований. В параллельных спектрометрах установлена жесткая, конструктивно выполненная система регистрации только определенных элементов. Как и пламенная ААС, ИСП-ОЭС наиболее подходит для определения элементов, находящихся на уровне частей на миллион в биообразцах. В отличие от пламенной ААС определение методом ИСП-ОЭС занимает меньше времени и требует меньшего количества образца (табл. 5-27). Пределы обнаружения метода ИСП-ОЭС недостаточны для определения в клинических образцах элементов, которые в норме присутствуют на уровне частей на миллиард (As, Se, Cr, Pb и др.).

Таблица 5-27. Преимущества и недостатки ИСП-АЭС

Преимущества	**Недостатки**
Высокая скорость анализа	Пределы обнаружения недостаточны для определения некоторых элементов в биообразцах (As, Se, Cr, Pb)
Значительно более редкие и менее серьезные проблемы с химическими, ионизационными и спектральными помехами по сравнению с ААС	Стоимость анализа от умеренной до высокой, однако она снижается с увеличением числа образцов
Для анализа необходим умеренный объем раствора образца (1–2 мл)	Помехи: спектральные наложения; влияние матрицы; самоабсорбция
Широкий линейный диапазон калибровки (свыше шести порядков)	–

ИСП-МС. Серьезным прорывом в ppt-область при анализе биологических объектов стала ИСП-МС (табл. 5-28). При работе в области столь низких концентраций приходится серьезное внимание уделять чистоте используемых реактивов и условиям работы в лаборатории. В анализе применяются особым образом очищенные реактивы и деионизованная вода. Использование горелки ИСП для ионизации пробы биологических субстратов в МС позволило преодолеть существенные (именно ввиду специфики объектов) недостатки способов ионизации пробы электронным ударом, химической ионизацией, ионизацией искрой. Однако в этом случае начинают проявляться значительные изобарные наложения, что негативно сказывается на селективности метода. Например, определению мышьяка по иону ^75^As^+^ мешает изобарный ион ^40^Ar^35^Cl^+^, определению кальция по иону ^44^Ca^+^ мешает углерод органической матрицы — ион ^12^C^16^O^16^O^+^. Решение задачи было найдено в приборах с *квадрупольным масс-анализатором* и *дискретно-диодным детектором.* Здесь ИСП, поддерживаемая в специальной горелке, способна эффективно генерировать однозарядные ионы из атомов пробы. Далее ионы фокусируются ионно-оптической системой, отделяются от полиатомных и изобарных ионов и направляются в квадрупольный анализатор масс-спектрометра, где разделяются по отношению массы к заряду (*m / z*) и поступают в детектор. Через масс-спектрометр в каждый момент времени пропускаются ионы со строго определенным соотношением *m / z*. Масс-анализатор в сочетании с *динамической реакционной (ячейкой) системой (ДРС)* позволяет избирательно разрушать молекулярные мешающие ионы, пропуская к детектору лишь ионы определяемых элементов, и осуществлять химическое разрешение ионных пиков. Влияние полиатомных ионов устраняется путем их избирательного разрушения специальными приемами. Достигаемые в квадрупольной ИСП-МС пределы обнаружения находятся на уровне десятых (Be, Na, V, Cr, Fe, Ni, As…) и сотых (Li, Mg, Mn, Co, Rh, In, Sb, Pb, U…) долей нанограммов в 1 л. Малый расход растворов пробы и достигаемая в квадрупольном масс-

анализаторе абсолютная чувствительность позволяют решить многие задачи элементного (а также изотопного, например, содержание ^238^U и ^235^U в ювенальных жидкостях) анализа биологических объектов. Производительность метода ИСП-МС достаточно высокая: в течение 2–3 мин в подготовленных пробах биологических объектов можно количественно определить до 40–50 элементов одновременно. Метод ИСП-МС отличается от ИСП-ОЭС принципом действия: в первом регистрируются отдельные ионы различных изотопов, а не оптические эмиссионные спектры, однако в обоих методах используется одна и та же система ввода образца.

Таблица 5-28. Преимущества и недостатки масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой

Преимущества	**Недостатки**
Весьма низкие пределы обнаружения (до сотых долей нанограммов на 1 л) более 70 элементов в одной пробе	Ограничение по содержанию сухого минерального остатка в анализируемом растворе (не более 0,1–0,25%)
Определение индивидуальных изотопов, возможно измерение изотопных отношений, применение изотопного разбавления	Помехи: изобарные наложения (устранены в новейших моделях приборов с газовыми реакционными и коллизионными ячейками); матричные влияния
Умеренный расход образца (1–2 мл)	Дорогостоящий вид анализа. При высокой загрузке оборудования стоимость существенно снижается
Возможность использования дополнительных систем ввода (атомизаторы, ультразвуковые и микрораспылители, лазерная абляция), что приводит к увеличению чувствительности, уменьшению объема образца, зонному анализу твердых объектов, уменьшению помех	Нельзя определить Bi

Пределы обнаружения, достигающие по некоторым элементам сотых долей единиц на триллион (*n*·0,01 нг / л) (1 ppt = 10^–10^% = 1 нг / л), широкий линейный диапазон калибровки (до девяти порядков) и умеренный расход образца (1–2 мл раствора) делают метод ИСП-МС универсальным среди сравниваемых методов.

Методом ИСП-МС (при использовании в качестве системы ввода электротермического атомизатора или специальных микрораспылителей) можно определять образцы объемом в несколько микролитров. Определение индивидуальных изотопов элементов методом ИСП-МС позволяет проводить исследования метаболизма токсикантов с применением стабильных изотопно-измененных смесей.

Одной из последних разработок в области МС является ее сочетание с лазерной техникой, что позволяет осуществлять испарение и ионизацию пробы воздействием лазерного облучения, а также использовать твердые пробы биологических объектов, спрессованные в таблетки.

Современные методы исследования большого массива проб биологических объектов (тканей, биологических жидкостей) методами ИСП-АЭС и ИСП-МС позволяют достоверно устанавливать дефицит или избыток элемента в организме человека, что представляет большой практический интерес для медико-биологических исследований XXI в. (см. п. 7.5).

В методах АЭС и ИСП-МС линейная зависимость с коэффициентом корреляции не менее 0,99 сохраняется в интервалале 0–25 нг / мл (нг / мг) или 0–250 нг / мл (нг / мг), что зависит от природы элемента и типа биообъекта. Внутри- и межлабораторные ошибки обычно не более 5 и 10% соответственно.

В современных хорошо оборудованных лабораториях приборы, в том числе и электронные аналитические весы, через соответствующие платы интерфейсов подсоединяют к общей шине, объединяя тем самым один или несколько приборов в единую систему — компьютерную сеть. Это позволяет контролировать доступ лиц, например администрации, к результатам анализа и делает невозможным оказание какого-либо влияния на них,

что очень важно при принятии ответственных решений, например в области ХТА, медицинских и других исследований. За рубежом такие системы называют LIMS (laboratory information and management systems).

Рентгенофлуоресцентный анализ (РФА) является перспективным методом определения элементов химического состава образца, который проводится по характеристическим рентгеновским спектрам. По сравнению с оптическими спектрами рентгеновские спектры состоят из небольшого числа линий в диапазоне длин волн от 0,01 до 10 нм.

Возникновение рентгеновских спектров происходит следующим образом. При бомбардировке вещества пучком ускоренных заряженных частиц высокой энергии с одной из внутренних электронных оболочек атома вырывается электрон и удаляется из атома. Образовавшаяся вакансия заполняется путем перехода электрона с одной из внешних оболочек, что сопровождается характеристическим рентгеновским излучением. Такое излучение наблюдается не только при бомбардировке электронами, но и при облучении поверхности электромагнитным излучением большой энергии, достаточной для выбивания внутренних электронов из атомов. Характеристический спектр называют флуоресцентным или вторичным.

Английский физик Мозли в 1913 г. установил, что корень квадратный из частоты спектральной линии характеристического излучения элемента есть линейная функция его порядкового номера *Z*:

$$\sqrt{\frac{v}{R}} = \frac{Z - S_n}{n},$$

где v — частота излучения; *R* — постоянная Ридберга; *S*~n ~— постоянная экранирования; *n* — главное квантовое число.

Как и в эмиссионной спектроскопии, качественный анализ проводят путем определения длины волны интересующих линий и их последующей идентификации. Длину волны в спектре обычно определяют с помощью известных опорных линий, являющихся своеобразными стандартами. В качестве стандарта может быть использовано известное вещество, специально вводимое в анализируемую пробу. Расшифровка спектров существенно облегчается благодаря наличию подробных таблиц. Осложнения при идентификации вызывают спектры разных порядков из-за наложения линий. Для надежности результатов находят нужную длину волны и оценивают интенсивность не одной, а нескольких спектральных линий. Среди них должна находиться наиболее интенсивная линия определяемого элемента. Предел обнаружения метода составляет в среднем 0,05–0,1%, а для некоторых элементов он снижается до 5 · 10^–3%^. Предварительная обработка образца химическими реагентами в ряде случаев позволяет значительно снизить предел обнаружения. Методом РФА можно исследовать как твердые, так и жидкие образцы (табл. 5-29).

Таблица 5-29. Преимущества и недостатки рентгенофлуоресцентного анализа

Преимущества	Недостатки
* Предел обнаружения 10^–2^–10^–3^%. * Метод неразрушающий. * Возможность анализировать твердые и жидкие образцы. * Метод многоэлементный. * Экспрессность (анализ одной пробы занимает 1–5 мин). * Возможность использовать водные растворы. * Анализ широкого круга объектов	* Сложное оборудование. * Ограничено количественное определение ряда элементов из-за одновременного усиления и ослабления излучения. * Относительно низкая точность. * Относительно низкая чувствительность

Количественное определение основано на пропорциональности между интенсивностью линий характеристического излучения и концентрацией элемента в пробе. На абсолютную интенсивность линий влияют условия возбуждения и другие факторы, а также химический состав пробы. Существуют различные способы количественного определения элемента методом РФА. В способе внутреннего стандарта сравнивается интенсивность линий

определенного элемента с линией стандарта — специально введенного в пробу элемента в точно известном количестве. Сравниваемые линии должны иметь близкие потенциалы возбуждения и не слишком отличаться по интенсивности. Удобным стандартом является соседний элемент периодической системы. Отношение интенсивности линий определяемого элемента и элемента-стандарта предполагается пропорциональным их концентрации: $I_x / I_{ст} = kC_x / C_{ст}$. Коэффициент k определяется эмпирически по интенсивности линий стандартных образцов. Преимуществом способа внутреннего стандарта является его независимость от наличия стандартных образцов. К недостаткам относится трудоемкость введения элемента сравнения в каждый анализируемый образец.

При определении способом внешнего стандарта интенсивность линии искомого элемента сравнивают с интенсивностью этой линии в спектрах стандартных образцов с известным содержанием. Отношение интенсивности линий принимают равным отношению концентраций элементов. Надежные результаты получаются при условии, когда состав анализируемой пробы и стандартных образцов по основным компонентам достаточно близок, так как интенсивность линий зависит от общего состава пробы.

Применяется также способ добавок и разбавления. В способе добавок к пробе прибавляют небольшое количество определяемого элемента. При способе разбавления в пробу вводят наполнитель, не содержащий определяемое вещество. Недостатком этого способа является большая погрешность в определении концентрации при малой величине добавки, так как разность между интенсивностями первоначальной пробы и пробы с добавкой мала.

РФА используется в особых случаях в криминалистике с целью идентификации личности по минеральному составу костной ткани (посмертно).

Нейтронно-активационный анализ (НАА) основан на возбуждении (активации) стабильных ядер определяемых элементов при облучении анализируемых образцов потоками ядерных частиц или квантов с достаточной энергией и регистрации наведенной радиоактивности.

При сближении нуклона с ядром до расстояния, на котором действуют ядерные силы, происходит ядерная реакция. Она протекает в две стадии: на первой из взаимодействующих частиц образуется составное ядро, которое существует около 10^–15^ с, на второй стадии ядро распадается на продукты реакции.

Продукт реакции представляет собой изотоп исходных или соседних элементов и характеризуется новым сочетанием Z (заряд) и A (массовое число).

Неустойчивые ядра, образовавшиеся в процессе ядерных взаимодействий, претерпевают самопроизвольный распад — радиоактивный распад. Периоды полураспада изотопов, используемых в НАА, составляют от нескольких секунд до нескольких лет. Более 90% радиоактивных ядер испытывают β-распад, при котором испускается электрон (или происходит захват электрона) с одной из орбит атома. Заряд исходного ядра при этом изменяется на ±1, массовое число A сохраняется. Ядерные характеристики, такие как период полураспада, энергия ß-частиц и γ-лучей, индивидуальны для каждого ядра. Поэтому измерение этих характеристик обеспечивает однозначную идентификацию элемента и, следовательно, высокую специфичность анализа.

Основной метод получения количественных результатов в НАА состоит в измерении интенсивности излучения радиоизотопов, образующихся в процессе облучения пробы. Между интенсивностью излучения и количеством определяемого элемента существует прямо пропорциональная зависимость.

На практике вместе с исследуемой пробой облучается эталон с известным содержанием определяемого элемента. Содержание искомого элемента m_x рассчитывают из соотношения содержание / интенсивность: $m_x / m_{эт} = I_x / I_{эт}$.

Обычно идентификацию и количественное определение проводят путем измерения активности радиоизотопа, обеспечивающего наибольшие избирательность, чувствительность и точность анализа.

Чувствительность определения максимальна при облучении, равном нескольким временам полураспада. Чувствительность будет максимальна при большей распространенности изотопа и потока активирующих частиц.

Специфичность схемы распада радиоактивного изотопа создает условия для однозначной идентификации и точного определения аналитического изотопа. Диапазон определяемых концентраций составляет от 10^–15%^ до 100%. Можно получить данные о содержании большого числа элементов в одной пробе.

По энергии нейтроны условно делятся на несколько групп, из них в методе НАА используются:

* тепловые нейтроны (0,005 эВ ≤ E ≤ 0,4 эВ); * резонансные нейтроны (0,4 эВ ≤ E ≤ 103 эВ); * промежуточные нейтроны (1 кэВ ≤ E ≤ 500 кэВ); * быстрые нейтроны (0,5 мэВ ≤ E ≤ 5 мэВ).

Ведущим является метод *НАА с использованием тепловых нейтронов.* Это обусловлено его универсальностью и избирательностью, так как при облучении большинства элементов тепловыми нейтронами протекает только одна реакция — образование радиоизотопа исходного элемента, причем различие параметров схем распада существеннее, чем при других способах активации. Основным источником тепловых нейтронов является ядерный реактор.

Методом НАА возможно определение элементов *in vitro* и *in vivo* (при соблюдении специальных мер защиты). Так, применение метода НАА позволило провести прямую количественную оценку степени минерализации скелета человека и отдельных фрагментов костной ткани. При определении использовали радиационный захват тепловых нейтронов ^48^Ca. Образующийся в результате радионуклид кальция удобен для спектрометрии (*T*~1 / 2~ = 8,8 года, выход 89%; *E* = 3,08 мэВ). При постоянных условиях облучения интенсивность излучения строго пропорциональна количеству элемента, например кальция.

При определении элементов *in vitro* могут быть использованы различные методики. Применение методики на основе радиохимического разделения элементов вызвано особенностями состава биообъектов. Основные компоненты в них — H, C, N, O, Na, Mg, P, I, Cl, K, Ca, большинство из которых слабо активируется при облучении нейтронами.

Пробу упаковывают в контейнеры из радиационно устойчивого материала. Производят совместное облучение образцов и эталона в потоке нейтронов ядерного реактора. Затем пробы выдерживают в горячей камере для снижения наведенной активности до безопасного уровня и проводят определение.

Например, методом НАА было проведено определение Ag, Au, Br, Cd, Co, Cr, Cs, Fe, Hg, Mn, Mo, Rb, Ru и Ta в волосах и ногтях жителей промышленных районов Онтарио. Пробы волос и ногтей гомогенезировали, отмывали, высушивали и помещали в алюминиевую фольгу. Затем подвергали облучению (*E* = 2 кэВ) и после снижения наведенной активности определяли уровень металлов. В результате было установлено, что ногти сильнее накапливают металлы по сравнению с волосами.

При определении Cu, Ce, Fe, P, Zn, Mo, Co в нормальных тканях мозга и при опухолях использовали НАА на тепловых нейтронах. Для этого пробы лиофилизировали, высушивали и облучали. При определении использовали стандартные изотопы. В ходе исследования было показано, что в опухолевых тканях накапливается медь, а содержание в них железа, фосфора, цинка и кобальта снижено.

С помощью метода НАА изучали изменение микроэлементного состава органов больных ишемической болезнью сердца, у которых содержание Ca, Co, Na увеличено в мышцах сердца, Na — в печени, Fe и Co — в почках. Содержание K в мышцах сердца, Mn в печени, Cr и Se в почках снижено.

НАА имеет абсолютно низкий порог обнаружения по сравнению с другими аналитическими методами (до 10^–15^ г). Однако дополнительные осложнения при работе этим методом, обусловленные опасностью радиоактивного излучения, удорожают анализ и требуют строгого соблюдения техники безопасности.

НАА относится к *арбитражным* методам с *длительным периодом* получения результатов (табл. 5-30).

Таблица 5-30. Преимущества и недостатки нейтронно-активационного анализа с использованием тепловых нейтронов

Преимущества	Недостатки

* Арбитражный метод. * Высокая селективность и чувствительность. * Диапазон определяемых концентраций от 10^–12%^ до 100%. * Предел обнаружения 0,001 нг / г. * Малая трудоемкость. * Возможность определения без разрушения образца. * Автоматизация

* Опасность радиоактивного облучения и заражения. * Дорогостоящее оборудование. * Специальные условия работы лаборатории. * Большая продолжительность анализа. * Одноэлементный анализ

Применение комбинированных систем — ВЭЖХ-ИСП-МС, ГЖХ-ИСП-МС, КЭ-ИСП-МС

Наука никогда не решает проблемы,
не поставив десяти новых.

Джордж Бернард Шоу (1856–1950),
ирландский драматург и романист,
лауреат Нобелевской премии по литературе (1925)

В последние годы были разработаны принципиально новые технологии биомедицинских исследований, которые изменили подход к определению метаболизма токсикантов *in vivo* (см. гл. 2). Это выдвигает на первый план потребность в новых аналитических возможностях, т. е. в методах, которые обеспечивают увеличениие производительности и получение мультиразличных данных, отражающих динамику происходящего процесса.

5.4.4. Гамма-резонансная (Мессбауэровская) спектрометрия как инструмент нанотехнологий

Национальной науки нет, как нет
национальной таблицы умножения.

Антон Павлович Чехов (1860–1904),
выдающийся русский писатель,
драматург, врач, общественный деятель

Ядерный гамма-резонанс, или эффект Мессбауэра*,* лежит в основе метода гамма-резонансной спектрометрии (**ГРС**). В 1958 г. в Институте медицинских исследований в Гейдельберге Р. Мессбауэр открыл эффект, который состоит в том, что испускание или поглощение γ-квантов атомными ядрами в твердом теле может происходить без возбуждения колебательных степеней свободы твердого тела, т. е. возможны переходы без отдачи ядра, когда импульс фотона принимает не отдельное ядро, а кристалл в целом. При радиоактивном распаде достаточно тяжелых элементов бóльшая часть образующихся атомов находится вначале в возбужденном ядерном состоянии. Через несколько микросекунд возбужденное ядро возвращается в исходное (основное) состояние, испуская излучение очень высокой частоты (10^18^–10^20^ Гц), лежащей в области γ-спектра. Это явление назвали «эффект Мессбауэра». Рудольф Мессбауэр стал лауреатом Нобелевской премии по физике 1961 г. Метод ГРС основан на установлении зависимости числа γ-квантов, прошедших через образец (т. е. интенсивности поглощенного γ-излучения), от частоты излучения γ-квантов радиоактивным изотопом. Относительная энергия основного и возбужденного состояний ядра атома зависит от электронной плотности около него. Сдвиг и расщепление линий испускания и поглощения может происходить под действием внутренних и внешних факторов, что дает возможность получить информацию о строении вещества. *Метод ГРС характеризуется уникальной селективностью, потому что резонансное поглощение наблюдается только для ядер одного вида.* Эффект наблюдали для 73 изотопов 41 элемента (от ^40^K до ^243^At). Наибольшее количество исследований выполнено с изотопами ^57^Fe, ^61^Ni, ^119^ Sn. Метод ГРС может давать не только количественную информацию об их содержании и валентном состоянии, но и информацию о кристаллической структуре вещества, в состав которых они входят, и т.д.

Сегодня ГРС является важнейшим методом исследований *в области нанотехнологий*, а в самое ближайшее время будет *арбитражным методом* оценки (на молекулярном уровне) степени опасности использования *медицинских наноразработок*.

Ограничения в применении ГРС (по сравнению с ЯМР-, ИК- или МС) связаны в первую очередь с тем, что эффект наблюдается только на ядрах определенных элементов. В СССР и РФ пионерами этого метода были академик В. И.

Гольданский, профессор И.П. Суздалев и их соратники.

Эффект Мессбауэра нашел применение во многих областях знаний, в том числе в фармацевтических и токсикологических исследованиях.

5.4.5. Спектрометрия ядерного магнитного резонанса. Применение комбинированных систем ВЭЖХ-ЯМР и ВЭЖХ-ЯМР-МС в метаболомике и метабономике

Чтобы строить, надо знать, надо овладеть наукой.
А чтобы знать, надо учиться. Учиться упорно, терпеливо.
Учиться у всех — и у врагов, и у друзей,
особенно у врагов. Учиться, стиснув зубы,
не боясь, что враги будут смеяться над нами,
над нашим невежеством, над нашей отсталостью.

Иосиф Виссарионович Сталин (1878–1953),
руководитель СССР, выдающийся политический,
государственный, военный и партийный деятель,
один из создателей советского государства,
Генералиссимус СССР (с 1945)

Определение любого токсиканта — системный процесс, включающий последовательное продвижение от менее специфичных методов к более специфичным. Не существует такого метода, который служил бы точным тестом для всех образцов везде и всегда. Выбор конкретного метода анализа определяется многими факторами (см. гл. 4). *Спектрометрия ЯМР относится к наиболее специфичным методам*.

Спектрометрия ЯМР (NMR) дает возможность получить детальную информацию на атомном уровне в сочетании с пониманием свойств целых молекул. Метод ЯМР-спектроскопии является одним из самых мощных инструментальных методов, доступных химико-токсикологической лаборатории. Метод служит для молекулярной идентификации, оценки деталей молекулярной структуры, установления конформаций и исследования молекулярной динамики. Большинство ЯМР-спектрометрических исследований было выполнено для идентификации структуры относительно небольших химических молекул, например углеводов. ЯМР высокого разрешения позволяет охарактеризовать индивидуальные компоненты в химических смесях и биосредах. Этим методом можно определять трехмерные структуры белков, исследовать сложные биологические матрицы (например, биологические жидкости), идентифицировать полиморфные соединения (твердофазная методика). Информационная эффективность метода ЯМР составляет тысячи бит.

В основе ЯМР лежит способность ядер некоторых атомов, имеющих магнитный момент, поглощать электромагнитное излучение, когда они находятся во внешнем магнитном поле. Этот инструментальный метод позволяет определять парамагнитные атомы (примером могут служить ^l^H, ^2^H, ^13^C, ^15^N, ^17^O, ^31^P, ^11^B, ^19^F). Теория ЯМР- спектроскопии подробно описана во многих учебниках, монографиях и обзорах.

Информативная ценность спектрометрии ЯМР ^1^H базируется на том, что протон, в зависимости от электронного окружения, поглощает излучение различных частот, так как в разной степени экранируется магнитными полями электронов и ядер. **Химический сдвиг** — это смещение резонансной частоты поглощения протона под влиянием электронного окружения. Химический сдвиг измеряют в безразмерных миллионных долях (м. д.) относительно выбранного стандарта — тетраметилсилана [(CH~3~)~4~Si] (ТМС).

Химический сдвиг ядер ^1^H *принят равным нулю*. Ядра атомов, представляющие интерес в токсикологических исследованиях, представлены в табл. 5-31. Обычные изотопы углерода и кислорода, ^12^C и ^16^O, не имеют магнитных моментов (магнитными свойствами обладают ядра, в которых сумма протонов и нейтронов равна нечетному числу) и не дают ЯМР-спектры. Ядро ^1^H, или протон, имеет самую высокую относительную чувствительность (после радиоактивного изотопа трития ^3^H). Изотоп ^13^C полезен для характеристики углеродного скелета органических молекул. Естественное содержание ^13^C составляет приблизительно 1,1%, поэтому шанс обнаружения двух ядер ^13^C в одной молекуле равен приблизительно 0,01%, что значительно

упрощает интерпретацию спектров. Поэтому в большинстве случаев ЯМР фокусируется на ^1^H и ^13^C. Ядро ^19^F почти столь же чувствительно, как ядро ^1^H (приблизительно 83%). ЯМР ^19^F спектроскопия используется при изучении метаболизма фторсодержащих соединений. Ядра ^15^N и ^31^P важны для определения структуры белка после его обогащения изотопами и как средство при исследовании различных фосфорилированных молекул, включая изучение метаболических процессов *in vivo*. ЯМР ^2^H, как и ЯМР ^1^H (протонный магнитный резонанс), используют в метаболомических и метабономических исследованиях, анализе жидких кристаллов, ЯМР ^15^N — в химии гетероциклов и ЯМР ^23^Na — при изучении процессов, связанных с внутри- и внеклеточными ионами натрия. Другие ядра, такие как ^29^Si, ^119^Sn, ^129^Xe, ^195^Pt и ^199^Hg, также находят применение в области судебной химии, криминалистики, биоэлементологии и экологии.

Таблица 5-31. Характеристика ядер атомов, представляющих интерес для химико-токсикологического анализа

Ядро	Спиновое число	Естественное содержание, %	ЯМР-частота, МГц	Сравнительная чувствительность
^12^C	0	98 / 99	—	—
^16^O	0	>99	—	—
^1^H	1 / 2	99,98	600,00	1,00
^3^H	1 / 2	0,06	39,98	1,21
^13^C	1 / 2	1,11	150,86	1,59 · 10^–^^2^
^15^N	1 / 2	0,37	60,80	1,04 · 10^–^^3^
^19^F	1 / 2	100,0	564,46	8,30 · 10^–^^1^
^29^Si	1 / 2	4,7	119,19	7,84 · 10^–^^3^
^31^P	1 / 2	100,0	242,88	6,63 · 10^–^^2^
^2^H	1	0,015	92,10	9,65 · 10^–^^4^
^14^N	1	99,6	343,34	1,01 · 10^–^^1^
^23^Na	3 / 2	100,0	158,71	9,25 · 10^–^^2^
^35^Cl	3 / 2	75,5	358,79	4,70 · 10^–3^
^17^O	5 / 2	0,037	81,34	2,91 · 10^–2^

Каждый сигнал в спектре протонного магнитного резонанса характеризуется тремя параметрами: *величиной химического сдвига, интенсивностью* и *величиной константы спин-спинового взаимодействия.* Резонансные линии каждого ядра могут быть расщеплены из-за спин-спинового взаимодействия, которое обозначается символом *J*, измеряется в герцах и не зависит от наблюдаемой частоты. **Константа спин-спинового взаимодействия J** характеризует расстояние между расщепленными линиями и является важнейшим параметром ЯМР-спектра. Существуют специальные таблицы данных со значениями химических сдвигов и различных спин-спиновых расщеплений, которые используют при интерпретации спектров. **Мультиплетность** — число сигналов, обусловленных спин-спиновым взаимодействием, — зависит от числа протонов *n* у соседних атомов и определяется по формуле $M = n + 1$.

В протонном магнитном резонансе магнитное поле заставляет атомы водорода в молекуле ориентироваться в определенном направлении. Для получения спектра с высокой разрешающей способностью создаваемое магнитом поле должно быть гомогенным по всей поверхности образца в датчике. При этом резонансные частоты для всех протонов в молекуле будут разными, так как зависят от молекулярного окружения ядра. Взаимосвязь между резонансными частотами и молекулярным окружением дает возможность судить о структуре анализируемого вещества. Спектр ЯМР прослеживается на двухмерной координатной оси *x / y.* Оценивая протонный спектр ЯМР, можно определить площадь под каждым пиком, которая указывает число ядер, совершающих переход, и число имеющихся протонов, т. е. возможен *количественный анализ.*

ЯМР ^13^C дает возможность определить число атомов углерода и их относительное расположение в молекуле. ^13^C является изотопом более распространенного ^12^C. Для СХА и метабонических исследований (см. ниже и гл. 2) используют дополнительные модификации ЯМР.

Модификации ЯМР

Для детального анализа соединений в биологических жидкостях применяется *двухмерная (2D) ЯМР-спектрометрия,* которая предоставляет корреляционную информацию, показывающую взаимосвязи резонансов ядер различных атомов в молекуле. Анализ данных 2D отвечает на вопросы:

* соответствуют ли резонансные пики протонам отдельной или разных молекул; * расположены ли протоны близко друг к другу в молекулах; * расположены ли протоны близко друг к другу в пространстве; * можно ли соотнести конкретный резонанс или мультиплет резонансов к конкретному протону в соединении.

Существует много разных вариантов 2D ЯМР-анализа, и полученные результаты зависят от того, каким из них был проведен анализ. Одним из наиболее распространенных 2D ЯМР-методов является *корреляционная спектроскопия (COrrelated SpectroscopY* — COSY*)*, с помощью которой получают перекрестные пики для двух ядер. Например, кросс-пики показывают, что два протона находятся в одной и той же молекуле.

Другим распространенным видом 2D ЯМР-методов является *ядерный эффект Оверхаузера (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* — NOESY*).* В этом случае интенсивности кросс-пиков больше зависят от расстояния между парой взаимодействующих ядер в пространстве, чем от структуры молекул. Поэтому метод NOESY применяется в основном для определения отдельных протонов или метильных групп. *Метод NOESY дает информацию о конформации молекулы и является ключевым элементом при определении структуры молекулы,* например структуры белков в растворах.

Третий тип 2D ЯМР-методов связан с разными видами ядер, например, резонанс ^13^C с резонансом ^1^H. Чаще применяется вариант этого метода — HSQC *(Heteronuclear Single-Quantum Coherence),* который коррелирует спектр ^1^H со спектром ^13^C.

Итак, COSY измеряет взаимодействие протон-протон (^l^H — ^1^H), а спектрометрия NOESY — взаимодействие протонов, которые находятся близко друг к другу, но не обязательно на соседних атомах. Полученные спектры COSY, NOESY и HSQC более трудны для интерпретации и требуют специальных знаний, однако значительно информативнее метода ЯМР ^1^H.

ЯМР — арбитражный метод ХТА

Метод ЯМР, обеспечивающий возможность определять трехмерную ориентацию некоторых индивидуальных атомов молекулы, позволяет непосредственно установить структурные изомеры. Однако такая информация обычно требуется в тех случаях, когда никакую другую информацию нельзя получить с использованием других инструментальных методов или когда нет основного аналитического стандарта для подтверждения присутствия определяемого вещества. Например, два хиральных энантиомера дают идентичные ЯМР-спектры в нехиральном растворителе. С помощью хирального парамагнитного реактива или хирального растворителя можно идентифицировать энантиомеры.

В судебно-химическом и криминалистическом анализе, например наркотиков, ЯМР — один из *арбитражных методов*, с помощью которого можно получить уникальную информацию о структуре неизвестного вещества или его идентифицировать.

ЯМР-спектрометрию применяют главным образом для идентификации *молекулярной структуры очищенных веществ*. Для химических образцов органической природы обычно используют разбавленный раствор в полностью дейтерированном растворителе: хлороформ-*d*, диметилсульфоксид-*d*, диметилформамид-*d*, циклогексан-*d* или ацетон-*d*.

Наиболее значимым отличием между исследованиями *биологических жидкостей* и исследованиями смесей органических соединений в химических реакциях является *присутствие воды, содержащей протоны.* Кроме того, в биологических жидкостях даже основные метаболиты обычно находятся в миллимолярных концентрациях, поэтому при анализе таких объектов важно подавить резонанс воды и использовать чувствительный спектрометр. Существует много способов *для подавления резонанса воды* или других растворителей, содержащих протоны. Один из них заключается в следующем. Биологические образцы, которые в значительной степени включают H~2~O,

лиофилизируют с последующим добавлением D~2~O, однако такой подход может привести к значительным потерям аналита. Поэтому вначале к образцу добавляют небольшое количество D~2~O и затем подавляют резонанс воды. Несмотря на то что лиофилизирование и растворение образцов в D~2~O занимают много времени, они могут существенно улучшить предел обнаружения и представить более полные данные о метаболитах, имеющих близкие к воде резонансные пики.

Некоторые физические характеристики биологических жидкостей (вязкость образцов, содержание белков, солей, жиров) влияют на вид ЯМР-спектров. Высокая вязкость растворов, присутствие белков и жиров, химические взаимодействия с образованием макромолекул могут привести к расширению резонансных линий, затрудняющих количественный анализ.

Адекватная *пробоподготовка* исследуемых образцов перед снятием ЯМР-спектров кардинальным образом влияет на их качество и в конечном счете на информативность метода. При исследованиях биологических жидкостей хорошие результаты получают, если используют ТФЭ или непосредственное присоединение ЯМР-спектрометра к системе ВЭЖХ. Современные методики позволяют нивелировать подобные трудности для многих образцов.

Сравнительные анализы биологических жидкостей, являющиеся задачей *метабономики* (см. гл. 2), в настоящее время проводят и с целью химико-токсикологического исследования. Сравнительные анализы требуют постоянства значений pH среды, так как изменения pH образца может влиять на получаемые резонансные пики. Как известно, при интоксикации отмечают значительные изменения pH биосред, особенно мочи, из-за нарушений механизмов регуляции pH. Для *подавления* изменений pH в образце добавляют высококонцентрированные буферы, *не содержащие протонов*, такие как натрия фосфат. Биологические образцы обычно содержат высокие концентрации солей, что снижает чувствительность метода ЯМР, поэтому, как правило, для стандартизации уровня pH добавляют 300–400 ммоль фосфатного буфера. Однако образцы, содержащие высокие концентрации фосфатов и органических соединений, представляют собой идеальные условия для роста бактерий, в связи с этим добавляют еще и антибактериальные средства. Обычно используют апротонные вещества, например натрия азид.

ЯМР-спектрометры

Почти все современные спектрометры, применяемые для установления химических структур, основаны на суперпроводимости магнита с операционной частотой (для ^1^H наблюдений) в диапазоне от 200 до 900 МГц. Разрешение и обнаружение улучшаются с увеличением силы магнитного поля. Наиболее распространены частоты 200, 250, 270 и 300 МГц. Начиная с 2003 г. все больше лабораторий используют ЯМР-спектрометрию с частотой 400–600 МГц. Более высокие частоты наблюдения (700, 750, 800 и 900 МГц) применяют в специализированных исследованиях, главным образом при определении структуры белков и других биополимеров. *Сочетание математического алгоритма Фурье-преобразования с ЯМР-спектрометрией* (см. п. 5.4.2.2) дало возможность использовать двухмерную и даже трехмерную ЯМР-спектрометрию, что улучшило чувствительность метода, сократило время анализа, позволило коррелировать химические сдвиги ^13^C, ^15^N или ^31^P и ^1^H.

ЯМР-спектрометры — очень дорогостоящие приборы, генерируют *сильное магнитное* поле, которое способно, например, разрушить зашифрованные данные кредитной карточки. Для интерпретации данных, получаемых с помощью ЯМР-спектрометра, требуются специалисты высокой квалификации.

Главным компонентом ЯМР-спектрометра является сверхпроводимый магнит сильного поля. Образец растворяется в дейтерированном растворителе и затем поступает в длинную цилиндрическую стеклянную трубку, обычно имеющую диаметр 5 мм. Трубка помещается в датчик ЯМР, находящийся вблизи от центра магнитного поля.

Обнаружение и идентификация малых количеств аналита в очень сложной биологической матрице со многими потенциальными взаимосвязанными переменными являются трудной задачей. ^1^H ЯМР-спектрометрия высокого разрешения позволяет решить подобную задачу.

Системы ВЭЖХ-ЯМР и ВЭЖХ-ЯМР-МС в метаболомике и метабономике

Невозможное было возможно,
но возможное – было мечтой…

Александр Александрович Блок (1880–1921),
великий русский поэт-символист
Серебряного века, классик
русской литературы XX века

Начало есть более
чем половина всего.

Аристотель (384–322 гг. до н.э.),
древнегреческий философ, ученик Платона,
воспитатель А. Македонского

В настоящее время активно развивается *метабономика* — новая технология количественного измерения динамического мультипараметрического метаболического ответа живых систем при патофизиологических или генетических изменениях (см. гл. 2). Изучение динамического и зависимого от времени профиля метаболитов *in vivo* приносит полезную информацию. Токсические эффекты, генетические и соматические заболевания могут проявляться нарушением синтеза некоторых белков, однако в конечном счете происходит изменение управления биохимическими процессами, что отражается на соотношении концентраций многих эндогенных веществ в потоках биологических жидкостей. Нарушение динамического равновесия в биологических жидкостях организма, вызванное заболеванием или интоксикацией, изменяет их качественный и/ или количественный состав. *Для установления факта происходящих изменений необходимо в плазме крови, моче или желчи определить одновременно множество метаболитов в широком диапазоне концентраций*. При этом используют образцы как после типовой пробоподготовки, так и без предварительного выделения.

Каждая биологическая жидкость, анализируемая методом ^1^H ЯМР-спектрометрии с частотой 800 МГц, имеет свой характерный спектр («отпечаток пальца»), что делает возможным идентифицировать нарушение метаболических профилей не только в крови или моче, но и в извлечениях из ткани и клеточных суспензиях. С этой целью используют специальные компьютерные программы *для проведения анализа основных компонентов и классифицируют образцы согласно их ЯМР спектральным профилям*.

Всегда возможно получение ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Однако чем больше проводится тестов, тем меньше вероятность ошибки. «Может ли спектральный анализ быть “правдивым”? Физические процессы, сопровождающие возбуждение спектра и его регистрацию, происходят в мире, где нет такого понятия… Только математическая статистика — гарант “правдивости”, знак качества результата анализа», — написал К. Дерффель в своей знаменитой книге «Статистика в аналитической химии».

В настоящее время эффективный способ извлекать значащую метабономическую информацию состоит в комбинировании ЯМР-спектрометрии высокого разрешения определяемой биологической жидкости с мультивариантными методами статистики.

Основные компоненты (ОК) — новые переменные, созданные от линейных комбинаций стартовых спектральных данных так, что каждый последующий ОК имеет определенное отличие от предыдущего, причем первый ОК в сравнении с другими имеет разницу в наборе данных в наибольшей степени. Участок первых двух или трех ОК дает лучшее представление о разновидности набора данных в двух или трех измерениях. Таким образом, создаются *карты ОК,* которые могут *визуально отразить* поведение образцов под влиянием любого ксенобиотика.

«Рисунок» ЯМР-спектра биологической жидкости или образца ткани определен его *метаболическим профилем*. Это достаточно простой подход для научных исследований. Однако в условиях протекания биохимических процессов *in vivo* все значительно сложнее, поскольку эффекты, вызванные генетической модификацией, болезнью, пищей, образом жизни, действием введенного препарата, развиваются в режиме реального времени. Для решения подобных многофакторных задач разрабатаны (и активно разрабатываются) автоматические методы классификации *метабономических данных, на* основе которой строится *математическая модель,* предсказывающая *правильный выбор* класса для каждого образца. Расчетные данные сравнивают с экспериментально полученным ЯМР-метаболическим профилем. Методика позволяет количественно описать статистические границы, которые характеризуют каждый класс образца в терминах их метаболических профилей,

и отличить образцы, которые не принадлежат ни к одному из классов. Образец может принадлежать как к единственному классу, так и ко многим классам. Построив исчерпывающий ряд моделей, можно предусмотреть классификацию для широкого диапазона биообъектов. В настоящее время благодаря возможностям такого подхода установлены биомаркеры токсических повреждений, вызванных рядом ксенобиотиков, генетических нарушений, нежелательных побочных эффектов лекарственных препаратов и пестицидов, фенотипов (т. е. метаботипов), сформированных в результате взаимодействия генотипов с внешней средой.

С помощью ЯМР-анализа были расшифрованы и уточнены многие метаболические процессы — от биосинтеза коферментов у микроорганизмов и регуляции метаболизма глюкозы у млекопитающих до реакций переноса метильной группы в структуре метаболита при токсических поражениях печени.

Как уже отмечалось, метаболическое профилирование непосредственно не связано с изучением метаболизма ксенобиотиков (см. гл. 2). Однако метаболические исследования применялись и для объяснения влияния первичных и вторичных продуктов метаболизма ксенобиотиков на человека. Например, при ЯМР-исследовании мочи и плазмы крови были обнаружены метаболиты, образование которых связано с токсическим действием хлорида ртути, гидразина и ряда антибиотиков.

Следует отметить, что ни одним из инструментальных методов исследования нельзя полностью показать всю сложность структуры метаболома прокариот или эукариот. Это зависит от генетической изменчивости, тканевого и клеточного разнообразия, качества питания и огромного числа разнообразных молекул, которые включает в себя метаболом. К тому же многие макромолекулярные структуры (например, мембраны) состоят из плотно, но динамично связанных небольших молекул. Поэтому задача аналитика состоит в том, чтобы доступными методами определить качественные изменения метаболитов, различающихся молекулярной массой, поляризацией, зарядом, устойчивостью. Еще одна сложность состоит в неравномерном распределении метаболитов различных веществ (например, глюкозы или стероидных гормонов) в биологических жидкостях и тканях. Поэтому растет популярность комбинированного метода ВЭЖХ-ЯМР при идентификации компонентов биожидкостей. Миниатюризация аппаратуры и возможность измерения пикомолярных количеств образца привлекают в настоящее время большое внимание. Уже существуют системы для ВЭЖХ-ЯМР, соединенные с Фурье-преобразователем, ИК- и масс-спектрометрометрами. В будущем такие системы дадут возможность анализировать смеси добавок полимера или идентифицировать *in vivo* неизвестные компоненты, не изолируя их в индивидуальном виде.

Определение компонентов в сложных биоматрицах проводят в объединенных аналитических системах ВЭЖХ-ЯМР-МС, что дает возможность быстрой полной и надежной идентификации. Схема ВЭЖХ-ЯМР-МС приведена на рис. 5-27.

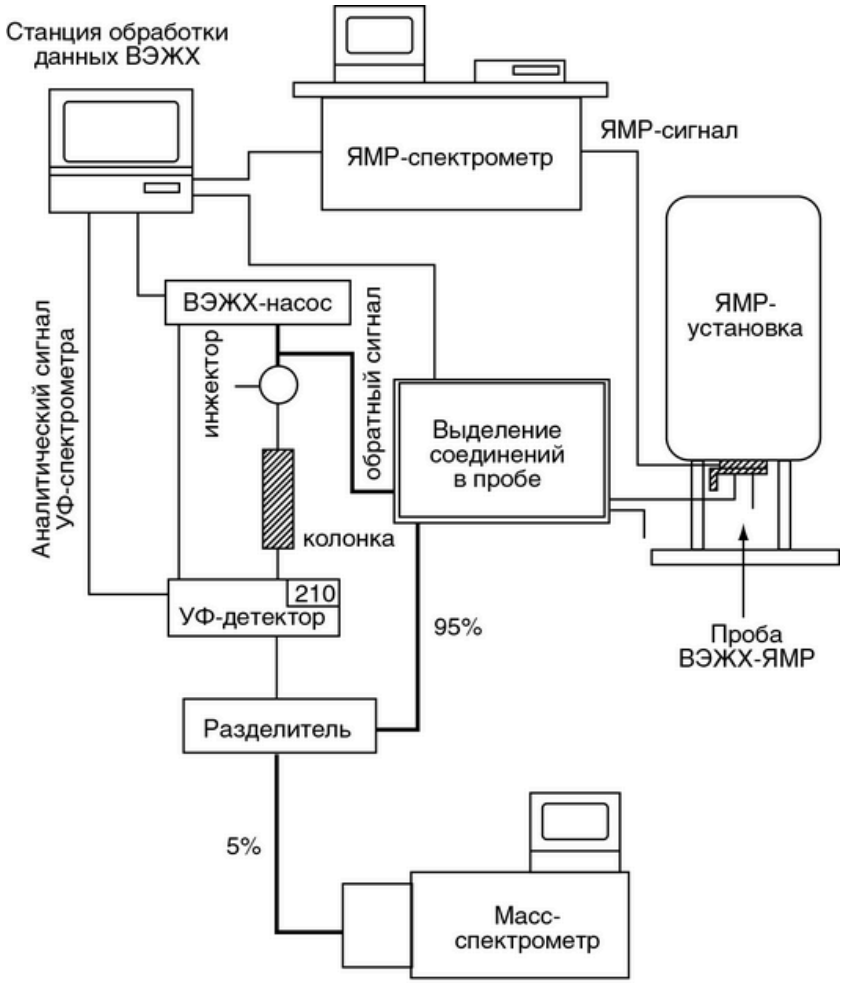


Рис. 5-27. Схема оборудования для ВЭЖХ-ЯМР-МС исследования: толстые линии — движение потока; тонкие линии — электронный контроль и сигналы данных

Длина и направление капиллярных трубок к этим спектрометрам могут быть отрегулированы так, чтобы или ЯМР-спектрометр, или масс-спектрометр сначала обнаружил элюат. Например, масс-спектрометр может помешать первоначальной идентификации ^19^F ЯМР-сигнала, идущего от определяемого образца. Поэтому ЯМР-спектрометр размещают перед масс-спектрометром.

В настоящее время существует несколько методик, позволяющих использовать системы ВЭЖХ-ЯМР. Самая простая из них — *обнаружение веществ по ЯМР-спектрам в режиме реального времени как непрерывного потока хроматографических пиков элюата*. Однако практически для обнаружения используют только ^1^H или ^19^F ЯМР-спектрометры.

Другой распространенный подход — *сохранение частей элюата в капиллярных петлях для более позднего автономного изучения ЯМР-спектра (выбор пика)*. Кроме того, поток может быть приостановлен в коротких интервалах времени при пропускании его через ячейку ЯМР («разрезание» времени) аналогично использованию диодного множества УФ-датчика (см. п. 5.4.2.1). Такая методика позволяет получить спектры от различных частей пика. «Разрезание» времени наиболее полезно, если разделение происходит недостаточно и трудно определить времена удерживания. В современных приборах возможен полностью автоматизированный анализ при контроле программного обеспечения. Автоматизированный анализ может быть приостановлен в любое время с возвращением к «ручному» контролю.

С помощью системы ВЭЖХ-ЯМР-МС можно получить ценные масс-спектрометрические данные, которые в дальнейшем будут использованы для оптимального выбора пиков и их ЯМР-анализа. Так, например, можно установить фрагменты гидроксилированного метаболита или глюкуронида токсиканта. ЯМР-спектры биологических образцов (биологических жидкостей) чрезвычайно сложны и содержат много тысяч резонансных поглощений. Получить максимальную информацию от сложных спектров можно при использовании машинных методов на основе данных специальных математических приемов — мультивариантной статистики.

Предел обнаружения и возможность количественного определения вещества зависят как от его химической природы, так и от класса технической сложности оборудования (например, разрешения соответствующего ЯМР-спектрометра). Интеграл резонанса в ЯМР прямо пропорционален количеству соединения в ЯМР-образце. Пределы обнаружения современных ЯМР-спектрометров пока позволяют определять метаболиты с концентрацией ≥0,1^—6 ^мМ. Предел обнаружения в методе ВЭЖХ-МС зависит от концентрации, степени ионизации компонента и технологического приема исследования иона (см. п. 5.3.5). С помощью современных систем можно обнаружить субпикомолярные количества молекул в 1 мкл образцов. Фактором, ограничивающим обнаружение ионов, является ионизация молекул в водном растворе. Степень ионизации для определенной молекулы различается в разных образцах. На исследуемый ион влияют солевые и буферные растворы, например, ион натрия быстро образует аддукт с кислородом, вызывая сдвиг в молекулярном ионе от M + H (M + 1) до M + Na (M + 23). Ионизация молекул может быть подавлена другими ионами при одновременном присутствии. Все это должно быть проконтролировано и учтено при анализе.

Многие типы образцов требуют пробоподготовки (деструкции тканей, центрифугирования, экстракции, концентрирования и др.). Например, для исследования образцов крови новорожденных вначале проводят экстракцию крови с фильтровальной бумаги; экстракт можно либо сразу исследовать в масс-спектрометре, либо сначала хроматографировать, а затем проводить МС-анализ. Некоторые стадии могут быть укорочены в зависимости от типа образца и метода анализа. При исследовании биологических жидкостей приготовление образца может включать добавление дейтерированного буфера и внутренних стандартов для ЯМР. Фильтрованные жидкости могут прямо исследоваться в масс-спектрометре. В любом случае полное качественное и количественное определение *метаболомов* в каком бы то ни было образце будет требовать одновременного использования различных методов. Поэтому применение той или иной аппаратуры для метаболомических исследований зависит от цели исследования, в частности от того, *является ли задачей исследования полная характеристика метаболомической структуры данного образца или сравнительный метабономический анализ*.

В первом случае оптимальным *является использование наиболее чувствительных спектрометров сильного магнитного поля и особых методик*. В ряде случаев для определения метаболитов с низким содержанием в пробе может потребоваться комбинированный метод ВЭЖХ-ЯМР.

Сравнительные метабономические исследования различных образцов, в которых концентрации солей, белков, величина pH и другие параметры варьируют в ограниченной степени, могут проводиться с помощью спектрометра низкого поля, однако при этом увеличивается общее время исследования. Например, при 300 МГц общее время исследования для достижения нужного уровня чувствительности увеличивается в 4,6 раза по сравнению с исследованием, проведенным при 500 МГц.

Кроме исследований мочи и плазмы крови, метабономические анализы также включают исследование содержимого клетки. Используются различные протоколы, зависящие главным образом от того, направлен анализ на гидрофильные компоненты клетки или липофильные. Надежные результаты получают после твердофазной экстракции аналитов. При этом повышается чувствительность при определении нуклеозидов, нуклеиновых оснований и монофосфатов нуклеозидов, но количественные характеристики триглицеридов занижены (ниже контрольных значений).

Метод ЯМР позволяет добиваться почти идеального спектрального разделения компонентов, поэтому анализ смеси, как правило, не требует дополнительного хроматографирования. *Однако если число компонентов очень большое или резонансные пики соответствуют больше метаболитам, чем основным компонентам, то используют комбинированный метод ВЭЖХ-ЯМР или ВЭЖХ-ЯМР-МС*.

Из всех хроматографических детекторов в настоящее время масс-спектрометры имеют наибольшее значение для полного метаболомического анализа. Это происходит благодаря быстрому развитию в последнее десятилетие масс-спектральных технологий. Появление электроспрейной ионизации расширило возможности МС при биологических исследованиях; МС крупных и высокополярных молекул теперь можно обнаруживать либо прямо из биологических образцов, либо после разделения, например, с помощью ВЭЖХ. К тому же инструментальные методы становятся менее объемными, а исследования с применением компьютерных программ открывают новые возможности. Эффективность масс-спектрального детектирования при метаболомических исследованиях связана

не только с высокой чувствительностью метода, но и с возможностью разделения метаболитов с помощью масс-спектрометра в соответствии с молекулярной массой при минимальном разрешении 1 а. е. м. Таким образом, в зависимости от разрешения конкретного масс-анализатора, количество полос (пиков) МС может варьировать в широких пределах. Наложение пиков в МС происходит, если анализируемые соединения имеют одинаковую молекулярную массу и одинаковую молекулярную формулу (например, различные гексозы). Такие соединения должны быть либо разделены хроматографически перед МС-анализом, либо подвергнуты тандемной МС-МС. Сегодня существует много типов масс-спектрометров, применяемых для метаболомических исследований.

Различные типы масс-спектрометров обсуждены в п. 5.3.5, из них важно выделить те, которые применяют при метаболомических исследованиях. Методы ионизации при атмосферном давлении (API) и ESI используют для перевода полярных метаболитов из водных растворов в газовую фазу в виде ионов. Как правило, многие гетероатомы и функциональные группы (например, —COOH и —NH~2~), которые содержит молекула, склонны к ионизации с помощью API. Однако API не позволяет произвести полную ионизацию всех типов биомолекул. Ионизацию можно увеличить при добавлении некоторых летучих буферов к растворителю (например, уксусная, муравьиная кислоты, трифторуксусная кислота и ацетат аммония). ESI-МС — самый распространенный метод исследования биомолекул, который можно использовать с различными масс-анализаторами, такими как квадруполь, ToF (времяпролетный) или резонанс Фурье-преобразователь — FT (см. п. 5.3.5). Важно, что ToF обеспечивает быстрое обнаружение спектров, высокую точность и разрешение. Однако метод ToF-МС имеет некоторые ограничения предела обнаружения, которые зависят от природы соединений.

Квадрупольные инструментальные методы из-за способности мониторировать ионы, используя тандемную МС (МС-МС, или МС^2^), на сегодняшний день являются «золотым стандартом» чувствительности и предела обнаружения.

Метод FT-МС имеет высокую разрешающую способность и дает четкие пики. Однако он сложен и применяется редко; понадобится время для того, чтобы FT-МС стал методом выбора при метаболомических исследованиях.

Для определения метаболитов, обладающих окислительно-восстановительными свойствами в биологических образцах (например, нейромедиаторы, флавоноиды и другие эндогенные антиоксиданты в плазме), и метаболомов митохондрий используют способы высокочувствительного электрохимического детектирования в ВЭЖХ. В зависимости от структуры и природы конкретного метаболита чувствительность метода находится в пределах 5–10 пг (пикограммов).

Эффективность работы систем ВЭЖХ-ЯМР-МС можно подтвердить примером. В нескольких крупных медицинских центрах США был проведен анализ 62 метаболитов мочи, включающих органические кислоты и аминокислоты, у пациентов, отобранных в группы по определенным показателям. Метод дал количественные данные (с отклонениями <15%) для большинства метаболитов и достоверно идентифицировал 105 из 108 больных с наследственными метаболическими заболеваниями.

Метаболические маркеры

С помощью метаболических маркеров можно провести сравнительные количественные анализы изменений специфических метаболитов плазмы и мочи при действии токсикантов. Получены сведения о некоторых метаболических маркерах, идентифицированных при исследовании мочи и других биологических жидкостей с помощью ЯМР.

Малотоксичные вещества могут вызывать *временные нарушения метаболизма* без нанесения большого вреда тканям и органам, но прибор зафиксирует метаболический профиль, отличающийся от принятой нормы. Поэтому интерпретировать результаты анализа необходимо с учетом наиболее полной информации о пациенте или потерпевшем.

В ближайшее время благодаря новым технологиям число уникальных биомаркеров будет значительно увеличено.

Определение концентраций основных метаболитов в моче является целью метабономических анализов, однако не менее важным и весьма информативным может быть изучение того или иного метаболита в условиях *in vivo*

в режиме реального времени. Такие анализы включают использование меченных изотопами прекурсоров определенных метаболитов и дальнейшее исследование образцов.

Классический аналитический подход к измерению метаболического уровня в биологических системах с использованием внутренних стандартов и построением калибровочных графиков *практически неприменим* для полных исследований сложных *метаболомов.*

Для автоматического анализа данных при определении метаболитов были разработаны специальные опознавательные компьютерные программы, коррелирующие результаты исследований многоаспектного набора данных (например, значения хроматографических времен удерживания, интенсивности масс- и ЯМР-спектров). Масштабы сокращения времени получения массива данных огромны. С помощью метода ВЭЖХ-ЯМР-МС- ToF в течение 20 мин (со скоростью пять спектров в секунду) можно создать 6000 характерных МС- и ЯМР-спектров, каждый из которых включает более 50 000 точек. Задача состоит в том, чтобы выделить все реальные масс-спектральные и ЯМР-характеристики для более тысячи потенциальных метаболитов в каждой хроматограмме. Одним из способов визуализации и анализа данных является создание контурных графиков, на осях которых указаны аналитические сигналы методов. Различия в контурах от образца к образцу отражают изменения в метаболических путях. При этом необходимо иметь *информацию* о том, какому *(острому или хроническому)* воздействию токсиканта подвергся обследуемый. В некоторых случаях краткосрочные изменения метаболизма при остром отравлении могут быть противоположны этим же изменениям, наблюдаемым у пациента при длительном воздействии токсиканта.

Несмотря на многие вопросы, требующие ответа исследователей, и несовершенство аналитических технологий, *метабономический анализ произвел революционный прорыв в токсикологии и фармакологии.*

5.5. Электрохимические методы определения токсикантов

Живые организмы построены из материи
и приводятся в движение энергией…
С какой бы стороны мы ни подошли к биологии —
со стороны ли материи или со стороны энергии —
мы так или иначе придем к электронам.

Альберт Сент-Дьёрди (1893–1986), американский
и венгерский биохимик, лауреат Нобелевской премии
по физиологии и медицине (1937)

Среди методов и средств, которыми располагает современная аналитическая химия, электрохимические методы для решения проблем охраны окружающей среды занимают одно из первых мест по частоте применения, а также используются при анализе пищевых продуктов и биосубстратов человека.

Электрохимические методы анализа — методы исследования растворов, основанные на изучении электрохимических свойств веществ, помещенных в электрохимическую ячейку.

Классификация электрохимических методов анализа представлена на рис. 5-28. К электрохимическим методам относят и несколько методов, в которых электродная реакция отсутствует, например *кондуктометрию* и КЭФ. КЭФ относят и к хроматографическим методам (см. п. 5.3.5).



Рис. 5-28. Классификация электрохимических методов

Сущность *кондуктометрии* состоит в измерении омического активного сопротивления раствора электролита переменному токуЧаще используют обратную величину — электропроводность., который обусловлен определенной подвижностью ионов в растворе. Изменение электропроводности в процессе аналитической реакции, например кислотно-основного взаимодействия, осаждения и других процессов, используют в кондуктометрическом титровании для индикации достижения конечной точки титрования. Если измерять полное сопротивление току высокой частоты, то можно обойтись и без погружаемых в раствор электродов. Так поступают в методе высокочастотной кондуктометрии (и титровании). Это особенно удобно при работе с токсичными веществами.

Потенциометрический анализ основан на измерении электродвижущей силы и электродных потенциалов как функции концентрации анализируемого раствора. В потенциометрических методах (электродная реакция происходит *в отсутствие тока*, см. рис. 5-28) измеряют величину электродного потенциала индикаторного электрода, которая зависит от активности (концентрации) потенциалопределяющих ионов.

Эта зависимость описывается уравнением Нернста. Метод широко применяют для определения pH растворов и биологических жидкостей, концентрации некоторых катионов и анионов (ионометрия), величины окислительно-восстановительных потенциалов, а также конечной точки титрования, отвечающей моменту окончания реакции — моменту эквивалентности (потенциометрическое титрование).

Методы *вольтамперометрии* (электродная реакция происходит *под действием тока,* см. рис. 5-28) основаны на использовании явления поляризации рабочих электродов, когда концентрации ионов в растворе и у поверхности электрода вследствие электрохимической реакции различаются и измеряемый потенциал электрода отклоняется от равновесного значения, предписываемого уравнением Нернста. Возникающий при этом ток — аналитический сигнал — называют диффузионным.

В *полярографии* анализируемое вещество, содержащее ионы металлов или некоторые органические соединения, обладающие полярографической активностью, подвергают электролизу на ртутном капающем электроде. Типичную поляризационную кривую, регистрируемую при этом, называют *полярограммой* (см. далее). Потенциал полуволны является характеристикой вещества, а высота волны — функцией концентрации. Связь величины диффузионного тока с концентрацией описывает уравнение Ильковича. Измерение предельного диффузионного тока используют также для нахождения конечной точки титрования в амперометрическом титровании.

Чувствительность классической полярографии (10^−5^–10^−7^%) можно повысить, используя способ *инверсионной вольтамперометрии*. Для этого следы определяемого вещества (металла) сначала концентрируют в покоящейся капле ртути, а далее при анодном растворении этого металла регистрируют пик тока и определяют концентрацию ионов металла. Более низких пределов обнаружения можно достичь, видоизменив способы развертки потенциала, прилагаемого к электрохимической ячейке, или регистрации возникающего электрического сигнала. Эти способы используют в методах *переменнотоковой полярографии*.

Кулонометрия основана на определении количества электричества, потребовавшегося для полного превращения электрохимически активного вещества. В этом методе измерения количества электричества и необходимые

расчеты по уравнению Фарадея могут быть с высокой точностью. Для автоматического поддержания необходимого режима электролиза используют специальные электронные устройства — потенциостаты. Электролиз в кулонометрии можно проводить *в двух режимах* — при поддерживаемом *постоянном токе* или при *постоянном потенциале рабочего электрода*, что удобнее. Еще более широко применяют кулонометрическое титрование, в котором электролиз используют для электрогенерации титрантов, в том числе неустойчивых при обычных условиях. Это делает кулонометрическое титрование пригодным для определения широкого круга неорганических и органических соединений. В особых случаях, например при определении меди, удается осуществить полное электроосаждение металла на электроде и определить его массу взвешиванием (*электрогравиметрия*).

Далеко не все методы, указанные на рис. 5-28, имеют равное значение при анализе токсикантов в биологических средах или при исследовании смещений электролитических равновесий в биологических жидкостях под влиянием токсического процесса.

Часть II

Глава 6. Метаболизм и определение наркотических средств..., психотропных и сильнодействующих веществ

Разум есть несравненно высшая
способность, но она приобретается
не иначе, как победой над страстями.

Николай Васльевич Гоголь (1809–1852),
великий русский писатель,
драматург, публицист, историк,
классик русской литературы

Упавший духом гибнет раньше срока.

Омар Хайям (1048–1131),
выдающийся персидский философ,
математик, поэт, астроном

6.1. Наркотическая и лекарственная зависимость. Основные понятия. Нормативные документы

По данным Министерства внутренних дел Российской Федерации, за 2021 г. изъято 23 т запрещенных и подконтрольных веществ, что на треть больше, чем в 2020 г. На фоне снижения зарегистрированных фактов сбыта наркотиков число лиц, привлеченных к ответственности, возросло почти на 10%. Количество преступлений, совершенных в групповых или организованных формах, зарегистрировано более 19 000, что составляет каждое пятое преступление в сфере незаконного оборота наркотиков. Ликвидировано 215 подпольных лабораторий. Закрыто порядка 70 000 сайтов и интернет-страниц, содержащих сведения о распространении наркотиков.

В настоящее время на территории Российской Федерации все действия, связанные с законным и незаконным оборотом наркотиков, регламентируются рядом законодательных актов и нормативных документов. К их числу относятся Уголовный, Уголовно-процессуальный и Гражданский кодексы Российской Федерации, федеральные законы Российской Федерации (в частности, ФЗ «О наркотических средствах и психотропных веществах»), постановления Правительства Российской Федерации, а также приказы соответствующих ведомств. В РФ 13 апреля 2016 г. в составе МВД организовано Главное управление по контролю за оборотом наркотиков (ГУНК МВД России). Ранее эти функции были возложены на Федеральную службу Российской Федерации по контролю за оборотом наркотиков (ФСКН России).

В настоящее время Федеральный закон «О наркотических средствах и психотропных веществах» № 3-ФЗ (вступил в действие 14 апреля 1998 г.) действует в редакции от 08.12.2020. Федеральный закон состоит из 8 глав,

включающих 57 статей. С его принятием в 1998 г. российское законодательство о наркотиках стало соответствовать *основным принципам трех международных конвенций*, принятых ООН:

* Единой Конвенции о наркотических средствах (1961); * Конвенции о психотропных веществах (1971); * Конвенции ООН о борьбе против незаконного оборота наркотических средств и психотропных веществ (1988).

В РФ существует пять видов веществ, незаконный оборот которых преследуется в рамках уголовного законодательства. Это *наркотические средства* и *психотропные вещества*, а также их *прекурсоры*, *сильнодействующие вещества* и *ядовитые вещества*.

Наркотические средства (НС) — это вещества синтетического или естественного происхождения, лекарственные препараты, растения, включенные в «Перечень наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации» (далее — Перечень) в соответствии с законодательством РФ, международными договорами РФ, в том числе Единой конвенцией о наркотических средствах 1961 г. *Наркотическое средство* — это фармакологически активное соединение естественного или синтетического происхождения, которое при резорбтивном действии способно подавлять поведение и восприятие боли, а при повторном применении вызывать психическую (или физическую) зависимость и развитие толерантности.

Психотропные вещества (ПВ) — это вещества синтетического или естественного происхождения, препараты, природные материалы, включенные в Перечень наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации в соответствии с законодательством РФ, международными договорами РФ, в том числе Конвенцией о психотропных веществах 1971 г.

Закон не указывает критериев различия между НС и ПВ. В основном это должны быть вещества из Списков II и III Конвенции о психотропных веществах 1971 г. В соответствии со ст. 2 Конвенции о психотропных веществах 1971 г. таковыми критериями являются:

* способность вещества вызывать состояние зависимости и оказывать стимулирующее или депрессивное воздействие на ЦНС человека, вызывая галлюцинацию или нарушение моторной функции, либо мышления, либо поведения, либо восприятия, либо настроения, или приводить к аналогичному злоупотреблению и аналогичным вредным последствиям, что и какое-либо вещество, включенное в Списки ПВ Конвенции 1971 г.; * есть достаточные свидетельства того, что имеет место или существует вероятность злоупотребления данным веществом, которое представляет или может представлять проблему для здоровья населения и социальную проблему, дающие основания для применения к этому веществу международного контроля.

Прекурсоры — это вещества, часто используемые при производстве, изготовлении, переработке НС и ПВ, включенные в Перечень наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации в соответствии с законодательством РФ, международными договорами РФ, в том числе Конвенцией ООН о борьбе с незаконным оборотом НС и ПВ 1988 г.

Сильнодействующие вещества (СДВ) — это вещества синтетического или природного происхождения, в том числе растения, включенные в Список сильнодействующих веществ, утвержденный Правительством Российской Федерации.

Ядовитые вещества (ЯВ) — вещества растительного, животного и минерального происхождения или продукты химического синтеза, включенные в Список ядовитых веществ, утвержденный Правительством Российской Федерации, и способные при воздействии на живой организм вызвать острое или хроническое отравление или смерть.

Одурманивающие вещества (ОДВ) — это средства, оказывающие одурманивающий эффект, в частности, изменяющие психику и поведение, и не входящие в Списки НС и ПВ. К таким веществам в соответствии с постановлением Правительства Российской Федерации № 1259 от 24.07.2021 относят смесь доксиламина с алкоголем, смесь димедрола с алкоголем, закись азота, ксенон.

Обнаружение одурманивающих веществ в обороте или хранении не является уголовно-наказуемым деянием. В Уголовном кодексе Российской Федерации имеется только одна ст. 23, где упоминается данная категория

веществ: «Лицо, совершившее преступление в состоянии опьянения, вызванном употреблением алкоголя, наркотических средств или других одурманивающих веществ, подлежит уголовной ответственности».

Аналоги наркотических средств и психотропных веществ — это запрещенные для оборота в Российской Федерации вещества синтетического или естественного происхождения, *не включенные в Перечень*, химическая структура и свойства которых сходны с химической структурой и свойствами наркотических средств и психотропных веществ, психоактивное действие которых они воспроизводят.

Незаконное изготовление, приобретение, хранение, перевозка либо сбыт наркотических средств, психотропных, сильнодействующих и ядовитых веществ *наказываются в соответствии с УК РФ*, вступившим в силу с 1 января 1997 г.

При этом на меру наказания помимо других факторов влияют **размеры количеств наркотических средств, психотропных и сильнодействующих веществ, находящихся в незаконном владении или обороте.**

Наркоманией называется группа заболеваний, которые проявляются влечением к постоянному приему в возрастающих количествах наркотических средств вследствие стойкой психической и физической зависимости от них с развитием абстиненции.

В нашей стране к наркомании относят патологическое пристрастие к веществам, которые указаны в Перечне, утвержденном Правительством Российской Федерации.

Употребление одним лицом сразу нескольких веществ из Перечня называют *полинаркоманией*. Злоупотребления другими веществами считают *токсикоманиями.*

В правовом аспекте термин «наркотическое средство» можно использовать только в случае, если он удовлетворяет *трем критериям*.

* Медицинский критерий состоит в том, что средство или вещество должно оказывать только специфическое действие на ЦНС (стимулирующее, седативное, галлюциногенное), которое было бы причиной его немедицинского применения. * Социальный критерий подразумевает, что немедицинское применение препарата приобретает такие масштабы, что становится социально значимым. * Юридический критерий исходит из общих вышеуказанных предпосылок и требует, чтобы соответствующая инстанция признала данное средство наркотическим и включила его в Перечень.

Критерии взаимозависимы и в правовом аспекте обязывают признавать средство наркотическим *только при наличии всех трех критериев*.

Термин «психотропные вещества» также употребляется как с медицинской, так и с юридической точки зрения. Международная конвенция о психотропных веществах 1971 г. определила, что в Список психотропных веществ могут включаться только те, которые вызывают патологическое привыкание, оказывают стимулирующее или депрессантное воздействие на ЦНС, вызывают галлюцинации или нарушение моторной функции, либо мышления, либо поведения, либо восприятия, либо настроения и если такое воздействие может представить собой проблему для здоровья населения или социальную проблему.

Термин «психоактивные вещества» целесообразно применять к тем веществам, которые не отнесены к наркотическим и психотропным веществам.

Лекарственная зависимость — форма зависимости, развивающаяся, как правило, в отношении психотропных препаратов. В соответствии с положением, разработанным ВОЗ в 1964 г., лекарственная зависимость определяется как состояние психической или физической зависимости от некоего вещества, действующего на ЦНС и принимаемого либо непрерывно, либо время от времени. Это определение охватывает по сути все биологически активные вещества и, следовательно, такие, как алкоголь, табак, наркотики и др.

Синдромы, общие для всех форм наркоманий:

* синдром измененной реактивности организма к действию данного наркотика (защитные реакции, толерантностьТолерантность — привыкание, снижение эффективности действия вещества (или пониженная реакция организма) при повторном введении., форма потребления, форма опьянения); * синдром психической зависимости (психический комфорт в интоксикации); * синдром физической зависимости (компульсивное влечение, потеря контроля над дозой, абстинентный синдром, физический комфорт в интоксикации).

Эти три синдрома, составляющие *большой наркоманический синдром*, отличают наркомана от здорового человека.

Под **психической зависимостью** понимают состояние, при котором химическое вещество вызывает чувство удовлетворения, психического подъема и которое требует периодически возобновляемого или постоянного введения средства для того, чтобы испытать удовольствие или избежать дискомфорта.

Под **физической зависимостью** понимают состояние, которое проявляется интенсивными расстройствами многих функций организма вплоть до летального исхода, когда прекращается введение соответствующего лекарственного средства. Характерные признаки физической зависимости:

* повторное введение вещества в течение нескольких недель; * обязательное сочетание с развитием толерантности; * проявление физической зависимости, как правило, сопровождается выраженной психической зависимостью; * проявления токсического действия вещества противоположны симптомам абстинентного синдрома; * отсутствие обязательной связи между перекрестной толерантностью и перекрестной физической зависимостью к препаратам разных групп; * максимальная интенсивность проявлений абстинентного синдрома в первые 4 сут после отмены с прекращением симптоматики через 1–2 нед.

При *абстиненции* резко проявляются вегетативные расстройства: сердцебиение, потливость, тахикардия. В костях и мышцах появляются мучительно-болезненные, тянущие боли («ломка»). Больным овладевает сильное беспокойство, сопровождающееся криками, стонами, возникают судороги (парестезия) конечностей, при этом отмечаются потеря аппетита, тошнота, рвота, диарея, боли в животе, бессонница.

Обман, подкуп, ложь, воровство — все пускается наркоманом в ход с целью раздобыть наркотик или что-либо его заменяющее.

Эйфорией обозначают состояние психики в наркотическом опьянении. Эйфория слагается из эмоциональных проявлений, психических и соматических (телесных) чувствований. Каждому наркотику свойственна особая структура эйфории.

Структура наркомании растянута во времени. В развитии болезни синдромы возникают не одновременно. *Сначала возникают синдром измененной реактивности и синдром психической зависимости*. Употребление сильных эйфоризирующих средств сопровождается проявлением первого болезненного признака — влечения (синдром психической зависимости). Употребление слабых эйфоризирующих веществ дает время для проявления симптомов, входящих в синдром измененной реактивности, затем становится наглядным влечение к повторному наркотическому опьянению. *Синдром физической зависимости формируется позже* на фоне возникших и продолжающих свое развитие синдромов измененной реактивности и психической зависимости.

Нередко говорят о *пристрастии*, рассматривая этот термин как синоним *зависимости*. Тем не менее между этими понятиями имеются существенные различия. По определению ВОЗ (1957), **пристрастие** — это состояние, связанное с периодической или постоянной интоксикацией, произвольно вызываемой потреблением натуральных или синтетических веществ и характеризующееся *четырьмя признаками*:

* непреодолимым стремлением к потреблению вещества; * тенденцией к постепенному увеличению вводимой дозы; * психической или физической зависимостью от токсиканта; * опасностью как для отдельного лица, так и для общества.

Зависимость является лишь одним из неотъемлемых атрибутов пристрастия.

В настоящее время принято выделять *шесть основных типов химического пристрастия*:

* морфиновый тип: сильная психическая и физическая зависимость с постепенным развитием толерантности; * барбитурат-алкогольный тип: выраженная психическая и физическая зависимость с развитием толерантности; * кокаиновый тип: сильная психическая зависимость при отсутствии физической зависимости; толерантность развивается только в условиях эксперимента; * каннабиноловый тип: выраженная психическая зависимость при отсутствии или слабо выраженной физической зависимости; отсутствие толерантности; * галюциногенный тип: выраженная до сильной психическая зависимость при отсутствии физической зависимости; значимая толерантность; * амфетаминовый тип: значимая, но индивидуально по-разному проявляющаяся психическая зависимость при отсутствии физической зависимости; сильная толерантность.

Для характеристики немедицинского применения психоактивных субстанций часто используют термин *«злоупотребление»*, который подчеркивает несовместимость приема данного вещества с существующими социальными нормами.

Вместе с тем именно общество в конкретных исторических условиях определяет перечень веществ, запрещенных для легального употребления. Например, в некоторых мусульманских странах запрещен прием алкоголя, но при этом употребление опия или гашиша не считается грубым поведенческим отклонением. Изменение политических и социальных условий нередко приводит к пересмотру официального отношения к психоактивным веществам. Не так давно правительство Ирана не только запретило наряду с алкоголем наркотики, но и ввело смертную казнь за их употребление и распространение. В других мусульманских странах (со светской формой правления) алкоголь фактически легализован. В Европе и США, несмотря на наличие длительных традиций употребления спиртных напитков, в разное время делались попытки запретить или резко ограничить употребление алкоголя («сухие законы» в дореволюционной России, США, Финляндии, СССР). В некоторых европейских странах традиционно негативное отношение к употреблению наркотиков постепенно трансформируется в свободный, контролируемый государством доступ к ним (так называемый британский подход).

Классификация наркотиков

По классификации Международного комитета по контролю над наркотиками наркотики делят по характеру их воздействия на ЦНС на три больших класса:

1) седативные вещества;

2) стимуляторы;

3) галлюциногены.

В каждом классе выделяют отдельные группы.

1. *Седативные вещества*:

* собственно наркотики (опиаты и опиоиды): героин, морфин, опиум, препараты опия, синтетические и полусинтетические вещества с морфиноподобным типом действия; * седативно-снотворные препараты: барбитураты, бензодиазепины, алкоголь, метаквалон;

2. *Стимуляторы*:

* кокаин; * стимуляторы амфетаминового ряда.

3. *Галлюциногены*:

* ЛСД-5, мескалин, псилоцин, МДМА и др.; * препараты конопли и синтетические каннабимиметики.

Диагностические признаки наркотического опьянения

Введение в организм любого наркотического или психотропного средства запускает в ход цепочку биохимических реакций, которая приводит к адекватному ответу клетки или органа либо целого организма в виде специфической реакции, которая может быть оценена визуально или с помощью различных приборов.

Опиатная эйфория слагается из ощущения соматического наслаждения и эмоционального фона покоя, блаженства, расслабленности, отрешенности от реального мира (нирвана). Внешние признаки наркотического опьянения:

* сужение зрачков; * бледность кожных покровов; * сухость слизистых оболочек и кожи; * гипотония; * угнетение дыхания; * пониженная активность кишечника; * запор.

Характерной особенностью морфиновой и героиновой наркомании является развитие абстиненции. Наркоманы, у которых абстиненция ярко выражена, принимают наркотики уже не для ощущения эйфории, а для того, чтобы подавить абстиненцию и быть работоспособными.

Эйфория после приема стимуляторов (кокаин, производные амфетамина) ощущается как активация интеллектуальной деятельности, душевный подъем, интеллектуальное просветление. Наркотическое опьянение сопровождается:

* повышенным настроением; * болтливостью; * возбудимостью; * ощущением прилива физических сил.

При приеме стимуляторов *выражена психическая зависимость,* физическая зависимость незначительна. Однако при отмене препарата часто проявляется выраженная депрессия с состоянием сильнейшей тревоги. Внешние признаки наркотического опьянения:

* расширение зрачков; * повышение температуры тела; * бледность кожных покровов; * физическое истощение при снижении или отсутствии аппетита.

Эйфория после приема галлюциногенов (ЛСД, гашиш) сопровождается расстройством восприятия в сочетании с особым состоянием сознания.

Лизергиновое опьянение характеризуется яркими, цветными фантастическими картинами, галлюцинаторными переживаниями, дезориентировкой во времени и пространстве. Теряется ощущение реальности, мир представляется захватывающе интересным. Нередки неадекватные поступки, приводящие к летальному исходу и тяжелым правонарушениям. Внешние признаки наркотического опьянения ЛСД:

* то расширение, то сужение зрачков в такт дыханию; * ощущение жара; * повышение температуры; * слюнотечение; * чувство голода одновременно с тошнотой.

Внешние признаки *гашишизма*:

* расширенные зрачки; * покраснение лица, дрожь в руках; * повышение либидо и потенции; * усиление аппетита.

Все вышеописанные симптомы являются *диагностическими признаками* для определения характера наркотического опьянения. Однако для установления факта употребления наркотиков необходимо *идентифицировать наркотическое средство в биопробах подозреваемого.*

6.2. Нейробиологические основы наркотической и лекарственной зависимости

Конец и вновь начало.

Сыма Цань (145–86 г. до н.э.), отец киайской историографии, создатель труда «Ши цзи», писатель, астроном

«Познай самого себя» — прекрасный и дельный совет;
жаль только, что древние не догадались указать
способ, как пользоваться этим советом…
Почему не оставили подробную инструкцию?

Антон Павлович Чехов (1860–1904), выдающийся русский писатель, драматург, врач, общественный деятель

В последнее десятилетие был достигнут значительный прогресс в исследовании нейрохимических реакций и нейроанатомической системы, которые имеют отношение к химической зависимости. Оказалось, что в процесс формирования пристрастия к алкоголю, опиатам и кокаину вовлечены общие биохимические механизмы, несмотря на то что каждое вещество, к которому развивается привыкание, действует на различные центры нейроанатомической системы.

Опиаты, по-видимому, взаимодействуют с системой удовольствий через опосредованную опиоидными рецепторами активацию мезолимбической дофаминовой системы. Кроме того, взаимодействуя непосредственно с опиоидными рецепторами ЦНС, опиаты и опиоиды вызывают соответствующую реакцию организма в виде анальгетического, эйфорического, седативного и других эффектов.

Кокаин является непрямым агонистом катехоламиновых рецепторов и, по-видимому, вызывает удовольствие в терминальных отделах мезолимбической дофаминовой системы.

Амфетамин и его аналоги обладают способностью высвобождать из гранул пресинаптических нервных окончаний норадреналин и дофамин и стимулировать таким образом центральные норадреналиновые и в большей степени дофаминовые рецепторы. Группа амфетаминов оказывает также небольшое ингибирующее влияние на активность моноаминооксидазы и тормозит обратный нейрональный захват дофамина и норадреналина.

Каннабис реализует свои эффекты через дофаминовые и серотониновые рецепторы.

Эффекты *ЛСД* проявляются путем воздействия на дофаминовую и серотониновую системы; в частности, галлюциногенный эффект обеспечивается влиянием на серотониновые рецепторы мозга.

Алкоголь активирует норадреналиновые рецепторы мезолимбической системы через каскад синаптических передач, включающих серотонин, эндогенные опиоиды и дофамин.

Ниже указаны предполагаемые механизмы развития абстиненции, вызываемой различными наркотическими средствами.

* Вещество — агонист рецептора (например, фенамин, наркотический анальгетик и др.) угнетает высвобождение нейромедиатора с одновременным уменьшением числа возбуждаемых рецепторов или изменением их функциональных свойств. Эти изменения более продолжительны, чем время действия агониста, поэтому в случае невведения вещества тонус нейромедиаторной системы понижается, что сопровождается развитием абстиненции. * Токсикант повышает выброс нейромедиатора из пресинаптических структур (например, усиление выделения дофамина при действии амфетамина) или блокирует его обратный захват (кокаин). В итоге запасы нейромедиатора при длительном введении истощаются. Отмена препарата приводит к выраженному дефициту трансмиттера, гипофункции медиаторной системы, что и сопровождается развитием абстиненции. * Препарат сенсибилизирует рецептор к действию нейромедитора. Развивающиеся при этом адаптивные процессы более продолжительны, чем действие вещества. В итоге прекращение введения вещества сопровождается гипофункцией нейромедиаторной системы с развитием синдрома отмены. * Вещества вызывают стойкие адаптивные изменения физико-химических свойств биологических мембран и вследствие этого нарушение их возбудимости. Отмена препаратов приводит к развитию абстиненции (спирты, органические растворители — алкоголизм, токсикомании).

Комплекс нейроанатомических структур и нейрохимических реакций, участвующих в формировании механизма химической зависимости, назван *нейромодулирующим каскадом удовольствий* (neuromodulator reward cascade). Нейрохимический дефицит медиаторов, являющийся результатом злоупотребления психоактивными препаратами, по-видимому, приводит к неконтролируемому поведению (страстному желанию) как у людей, так и у животных.

Нейромодулирующий каскад удовольствий. Серотониновые нейроны, на поверхности которых находятся рецепторы (5-СН или 5-НТ), в гипоталамусе проецируются на метэнкефалиновые нейроны (МЭнк), ингибирующие мезенцефалическую проекцию ГАМК-нейронов (рецепторов). Эти нейроны, в свою очередь, ингибируют дофаминовые (ДА) нейроны, которые проецируются как на ростральные ядра шва, так и на латеральные дофаминовые нейроны миндалины. ДА-нейроны миндалины связаны нервными волокнами с КА~2~-областью

гиппокампа. Норадреналиновые (НА) нейроны синего пятна (locus coeruleus) локализуются в области гиппокампа, которая содержит норадреналин. ГАМК-нейроны, находящиеся внутри гиппокампа, направляются к различным НА-содержащим КА~х~-областям. Нейропептиды регулируют опиоидные нейроны, которые действуют на активированный ДА в ядрах шва (nucleus accumbens). Предполагают, что МЭнк ингибирует неизвестный интернейрон, который, в свою очередь, вызывает взаимодействие ДА и дофадекарбоксилазы. Представленный механизм (экспериментально доказанный) тем не менее является упрощенным.

У всех веществ, способных вызвать синдром зависимости, имеется о*бщее звено* фармакологического действия — характерное влияние на *катехоламиновую нейромедиацию* в лимбических структурах мозга, в частности *в системе подкрепления («системе награды»).* Эта система участвует в обеспечении регуляции эмоционального состояния, настроения, мотивационной сферы, психофизического тонуса, поведения человека в целом, его адаптации к окружающей среде.

DARPP-32 (дофамин- и цАМФ-регулируемый фосфопротеин с молекулярной массой 32 кД) в больших количествах синтезируется в нейронах прилежащего ядра — отдела мозга, составляющего часть «системы награды», и принимает участие в реагировании нейронов на дофамин. *DARPP*-32 регулируется двумя нейротрансмиттерами (дофамином и глутаматом). Дофамин активирует *DARPP*-32 через *D*1-рецептор и блокирует через *D*2-рецептор. Глутамат через N-метил-D-аспартат-рецептор подавляет активность *DARPP*-32.

Даже небольшие изменения уровня фосфорилирования *DARPP*-32 вызывают каскад серьезных изменений в головном мозге. Наркотики-депрессанты, такие как опиаты, снижают уровень фосфорилирования *DARPP*-32, а стимулирующие наркотики, например кокаин, увеличивают уровень его фосфорилирования.

Формирование наркотических зависимостей — это формы *долговременной памяти*, требующие долговременных изменений в структуре нейронов. Такие изменения могут включать отращивание новых нервных окончаний и межнейронных контактов — синапсов, а также усиление или ослабление имеющихся синапсов. Однако о том, что происходит с нейронами «системы награды» в результате стимуляции дофаминовых рецепторов, до сих пор известно очень немногое. В результате возбуждения дофаминовых рецепторов класса *D*1 к определенному месту белка *DARPP*-32 (а именно к аминокислоте *треонину в 34-й позиции*, *Thr*34) присоединяется остаток фосфорной кислоты (происходит фосфорилирование по *Thr*34), что приводит к изменению свойств белка. Он приобретает способность подавлять активность другого белка — *PP1 (multifunctional serine / threonine protein phosphatase-1)*. Подавление активности белка *PP*1, в свою очередь, приводит к изменениям в степени фосфорилирования рецепторов и ионных каналов, играющих ключевую роль в синаптической передаче нервных импульсов и в пластичности синапсов. Изменения такого рода имеют *кратковременный характер* и происходят в цитоплазме нервной клетки. *Для долговременных изменений необходима регуляция активности ядерных генов*. У белка *DARPP*-32 имеется еще один важный «сайт фосфорилирования» — аминокислота серин в 97-й позиции (*Ser*97). Фосфорилирование этого аминокислотного остатка служит сигналом для молекулярных систем, транспортирующих белки через ядерную мембрану. *Оказалось, что если белок DARPP-32 фосфорилирован по Ser97, он накапливается в цитоплазме, а если нет — транспортируется в ядро.* Эксперименты показали, что кокаин, морфин, а также процесс обучения каким-нибудь действиям с положительным подкреплением приводят *к дефосфорилированию DARPP-32 по Ser97* и, как следствие, к накоплению этого белка в ядре.

DARPP-32, попав в ядро, делает то же, что и в цитоплазме, — подавляет активность многофункционального белка *PP*1. Прямым следствием инактивации *PP*1 в ядре является фосфорилирование гистона *H*3 (гистоны — белки, на которые «намотаны» молекулы ДНК в ядре). Фосфорилирование гистона *H*3, в свою очередь, приводит к активизации множества различных генов. *Фосфорилирование гистона H3 — важный компонент формирования долговременной памяти*. «Роль *DARPP*-32 можно сравнить с воронкой песочных часов. Цепочка биохимических реакций, вне зависимости от того, что ее вызывало, поражает нервную клетку только через этот белок» [Нобелевский лауреат 2000 г. в области медицины Пол Грингард (Paul Greengard), один из авторов открытия молекулы *DARPP*-32].

Нейробиологические основы зависимости нельзя рассматривать в отрыве от сложных психофизиологических и психосоциальных факторов, особенностей структуры личности больного наркоманией.

Опиоидные рецепторы

Здесь нужно, чтоб душа была тверда,
Здесь страх не должен подавать совета…
…
И все, что светом было, стало кровью…

Данте Алигьери (1265–1321), итальянский поэт, богослов,
политический деятель, автор «Божественной комедии»

Опиоидная система включает:

* опиоидные рецепторы; * опиоидные пептиды; * ферменты, осуществляющие синтез и расщепление опиоидных пептидов.

Открытие опиоидных рецепторов и медиаторов, взаимодействующих с рецепторами в различных отделах мозга, рецепторных зон на поверхностных мембранах нейронов, высокоаффинных к молекулам морфина, имело большое значение для изучения механизма формирования опиатной зависимости.

Опиоидный рецептор — это клеточный рецептор, способный избирательно взаимодействовать с морфином или некоторыми нейропептидами (энкефалинами, эндорфинами, динорфинами). Конформационное состояние опиоидного рецептора, способного к взаимодействию, определяется в первую очередь концентрацией ионов натрия в среде, окружающей клетку.

По своему составу опиоидные рецепторы гетерогенны и подразделяются на следующие *типы*:

* мю (μ) -рецепторы; * дельта (δ) -рецепторы; * каппа (κ) -рецепторы; * сигма (σ) -рецепторы; * эпсилон (ε) -рецепторы.

Действие морфина в организме опосредуется опиоидными рецепторами μ-типа, локализованными в ЦНС и на периферии. Плотность μ-рецепторов убывает в следующем ряду структур головного мозга: стриатум, неокортекс, таламус, прилежащее ядро, гиппокамп, миндалина. Менее богаты μ-рецепторами задние рога спинного мозга, околопроводное серое вещество и ядра шва. Очень низка плотность μ-рецепторов в гипоталамусе. На периферии μ-рецепторы обнаруживаются в *n. vagus*, симпатических ганглиях, а также в тканях сердца и ЖКТ. В сердце плотность μ-рецепторов особенно высока в сердечном ганглии и параганглиальных клетках.

Опиоидные μ-рецепторы относятся к *метаботропному типу*, т. е. передача информации внутрь клетки после связывания с агонистом осуществляется путем модуляции различных систем вторичных посредников при участии ассоциированных с мембраной гуаниннуклеотидсвязывающих белков — *G-белков* (см. гл. 2).

В свою очередь, типы опиоидных рецепторов подразделяют на подтипы. Так, предполагают, что μ-рецепторы делятся на два подтипа: μ~1~-рецепторы, активация которых вызывает аналгезию, и μ~2~-рецепторы, стимуляция которых приводит к угнетению дыхания, замедлению сердечного ритма и снижению моторики кишечника. Данные генетического анализа не подтверждают это предположение. Однако доказано, что опиоидные рецепторы сопряжены и с тормозными *Gi*-белками, и с возбуждающими *Gs*-белками, поэтому не исключено, что это может быть одна популяция рецепторов, но ассоциированная с различными *G*-белками (см. гл. 2).

Недавно было высказано предположение, что возрастание *толерантности* (как эффект длительного введения морфина) может быть связано с увеличением концентрации так называемых конститутивных форм μ-рецептора (μ*-рецепторов), которым для активации систем вторичных посредников не требуется связывания агониста. Переход μ-рецепторов в μ*-форму осуществляется путем фосфорилирования μ-рецепторного белка и регулируется специфической рецепторной протеинкиназой.

Основным фактором развития опиатной толерантности и формирования зависимости считают модуляцию систем вторичных посредников (см. гл. 2).

Пути трансдукции внутриклеточного сигнала с участием опиоидных рецепторов:

* модуляция активности аденилатциклазы; * модуляция активности фосфолипазы С; * модуляция активности потенциалзависимых кальциевых и калиевых каналов.

Существует несколько гипотез развития опиатной толерантности. По одной из них, длительное введение морфина значительно *изменяет уровни G-белков* (нарушается экспрессия мРНК, кодирующих синтез *G*-белков). Изменение активности *G*-белков оказывает влияние на функциональное состояние системы подкрепления («награды»).

В основе другой гипотезы развития опиатной толерантности лежит *изменение аденилатциклазной активности*. Механизм дезинтеграции аденилатциклазной системы при длительном введении морфина связан с нарушением процесса взаимодействия опиоидных рецепторов с *G*-белками. Морфин (героин), связываясь со специфическими рецепторами, вызывает ингибирование аденилатциклазы. Если действие морфина (героина) продолжается, то включаются компенсаторные клеточные механизмы, благодаря которым происходит увеличение числа молекул аденилатциклазы и, следовательно, повышение концентрации циклического 3',5'-аденозинмонофосфата (цАМФ) до нормального уровня. Компенсаторная реакция включает также «up-регуляцию» цАМФ-зависимой системы вторичных посредников, например, увеличение активности протеинкиназы А, что, в свою очередь, может вызывать адаптивные изменения в опиоидных μ-рецепторах. Таким образом, образование конститутивных форм μ-рецептора может быть не чем иным, как конечным звеном адаптивной перестройки при длительном воздействии агониста.

Сродство опиатов и опиоидов к определенному типу рецепторов объясняет различия в их фармакологическом действии.

μ-*Рецепторы* реализуют следующие эффекты наркотиков:

* супраспинальную аналгезию; * эйфорию; * угнетение дыхания; * физическую зависимость.

δ-*Рецепторы* имеют высокое сродство к энкефалинам.

Различают несколько подтипов к-*рецепторов*. Лигандами для к-рецепторов являются иные бензоморфановые препараты (например, *группы тебаина и орипавина*) и/или соединения другой природы (например, *фенциклидин и кетамин*). Через к-рецептороры реализуются:

* спинальная аналгезия; * миоз; * седативные эффекты; * гипотензия.

В табл. 6-1 обобщены реализуемые эффекты μ-, δ-, к- и σ-опиоидных рецепторов.

Проблема боли и обезболивания с давних времен привлекала внимание людей. Боль — комплексная гомеостатическая реакция. Инициация боли и контроль над ней относятся к нормальным физиологическим механизмам, направленным на предупреждение повреждения организма. Феномен боли реализуется через специализированную многокомпонентную систему, ноцицептивный компонент которой воспринимает и анализирует боль, а антиноцицептивный — регулирует и подавляет ее.

Механизм аналгетического действия морфина заключается в нарушении суммирования болевого импульса. В таламусе, который является коллектором боли, происходит суммирование болевых импульсов. Если ввести морфин и нанести одиночный болевой раздражитель (одиночный укол), то организм отреагирует на такую боль. Морфин действует только для устранения множественного потока болевых импульсов, например, с раневой поверхности. Морфин оказывает влияние на лимбический отдел мозга, где происходит эмоциональное восприятие, нарушает эмоциональную и психическую оценку боли, устраняет страх, ужас.

Таблица 6-1. Реализуемые эффекты опиоидных рецепторов

Реализуемый эффект	**Тип рецептора**		
	μ / δ	к	σ
Аналгезия	Супраспинальная / спинальная	Спинальная	—
Угнетение дыхания	++	+	—
Зрачок	Сужение	—	Расширение
Перистальтика кишечника	Снижение	—	—

Спазм гладкой мускулатуры	++	—	—
Поведенческие реакции	Эйфория ++	Дисфория +	Дисфория +
	Седация ++	Седация +	Психотомиметический эффект +
Физическая зависимость	++	+	—

В путях передачи и интеграции оценки боли медиаторами являются *специфические пептиды — эндорфины* и *энкефалины*, которые обеспечивают эффект обезболивания, связываясь с опиатными рецепторами. ИХМ позволили установить распределение энкефалинов в тканях мозга, которое повторяет распределение опиоидных рецепторов. Кроме тканей мозга, высокая концентрация энкефалинов была обнаружена в эпителии ЖКТ позвоночных, что, очевидно, объясняется филогенетической близостью пищеварительной и нервной систем. Увеличение содержания медиаторов (агонистический эффект) приводит к торможению, уменьшению боли. Морфин относится к агонистам опиоидных рецепторов, повторяя эффект эндорфинов и энкефалинов, способствует выбросу эндорфинов из пресинаптической мембраны. Однако морфин оказывает и непрямое действие. Эндорфины и энкефалины разрушаются ферментом энкефалиназой. Непрямой эффект морфина связан с угнетением активности этого фермента.

Распространенность опиоидных рецепторов и их чувствительность весьма различаются у конкретных индивидуумов, причем мужчины в основном хуже переносят боль, чем женщины.

Серотонин и депрессии

Все пройдет. Страдания, муки, кровь, голод и мор.
Меч исчезнет, а вот звезды останутся, когда и тени наших
тел и дел не останется на земле… Так почему же мы не
хотим обратить свой взгляд на них? Почему?

Михаил Афанасьевич Булгаков (1891–1940),
выдающийся русский и советский писатель,
драматург, тетральный режиссер, актер

Серотонин (5-гидрокситриптамин) — нейромедиатор ЦНС. Он является одним из физиологически активных биогенных аминов в организме животных и человека, промежуточным продуктом метаболизма триптофана, происходящего в основном в хромаффинных клетках тонкой кишки, серотонинергических нейронах мозга, тромбоцитах крови. Серотонин оказывает сильное влияние на тонус сосудов, принимает участие в гуморальной регуляции функций центральной нервной, пищеварительной, выделительной и эндокринной систем. Нарушения в обмене серотонина, его недостаток в организме приводят к депрессии, шизофрении, бессоннице, инфаркту миокарда, язвенной болезни и другим формам патологии, снижают настроение, подавляют сексуальные желания, влияют на память. Несмотря на жизненно важную роль серотонина, содержание его в организме весьма мало́. Например, почти весь серотонин циркулирующей крови сконцентрирован в тромбоцитах (содержание серотонина 0,02–0,6 мг / л).

Изменение обмена и функций серотонина в ЦНС под действием галлюциногенов (ЛСД, мескалин и др.) и наркотиков амфетаминового ряда сопровождается изменением концентрации серотонина в крови. Основным механизмом действия экстази является усиленный выброс серотонина в мозг, что и обусловливает все приятные эффекты. Когда запасы серотонина истощаются, человек становится усталым и раздражительным. По-видимому, происходит гибель продуцирующих серотонин клеток. Например, данные судебно-химической экспертизы свидетельствуют о значительном снижении (более чем на 80% средней нормы) содержания серотонина в мозге человека, погибшего от передозировки экстази. Однако до тех пор пока подобные результаты не будут коррелировать с данными генентической экспертизы (см. гл. 2), можно сделать и обратный вывод. Человек с генетически обусловленным низким уровнем серотонина с большей вероятностью будет использовать наркотик во все возрастающих дозах.

Определение уровней сывороточного серотонина имеет большое диагностическое значение, в том числе при длительном употреблении наркотиков. В результате специального наблюдения над большой группой

испытуемых с близкими исходными уровнями серотонина было установлено меньшее количество серотонина в определенных зонах мозга людей, принимавших амфетамины, по сравнению с контрольной группой (генетические исследования не проводились), причем женщины оказались чувствительнее к потере серотонина, чем мужчины. Поскольку серотонин относится к медиаторам ЦНС, то различные изменения окружающей обстановки могут влиять на его концентрацию в организме даже здорового человека. Поэтому при выборе метода определения биогенных аминов необходимо определить цели и задачи, которые ставит перед собой исследователь (см. ниже и гл. 5). Однако наилучшие результаты можно получить при метабонических исследованиях комбинированным методом ВЭЖХ-ЯМР-МС.

Никотиновая зависимость и злоупотребление никотином

Повелевать собою — величайшая власть.

Марк Туллий Цицерон (106–43 гг. до н.э.),
древнеримский оратор, философ, политик

Сигарета – с одной стороны уголек,
с другой – дурак.

Джордж Бернард Шоу (1856–1950), ирландский
драматург и писатель, лауреат Нобелевской
премии по литературе (1925)

В течение 10 с после вдоха табачного дыма никотин достигает мозга и начинает действовать на определенные группы нейронов, на поверхности которых находятся рецепторы. Как известно, нейромедиаторы посредством рецепторов заставляют мозг вырабатывать те или иные вещества, участвующие в регуляции работы всего организма. *Никотин, не являясь нейромедиатором,* способен связываться с рецепторами, предназначенными для другого вещества — *ацетилхолина.* Никотин запускает работу ацетилхолиновых рецепторов в отсутствие АХ. Более того, он делает эти рецепторы неспособными реагировать на воздействие АХ, снижая их чувствительность к нему. Снижение чувствительности рецепторов на фоне хронического потребления никотина приводит к образованию *дополнительного количества ацетилхолиновых рецепторов в головном мозге.* В результате мозг курильщика имеет огромное число ацетилхолиновых рецепторов, отличающихся повышенным сродством к никотину. *Воздействие никотина на ацетилхолиновые рецепторы приводит к усилению продукции ряда других веществ*. К ним относятся:

* норадреналин; * серотонин; * дофамин; * АХ; * ГАМК; * глутамат; * эндорфины; * эндогенные каннабиноиды.

Норадреналин действует как стимулятор. Он определяет уровень бодрствования головного мозга, обеспечивает концентрацию внимания, энергию, побуждения. Это вещество влияет на весь организм: повышает артериальное давление, увеличивает частоту сердечных сокращений и дыхания, что в целом способствует рабочей мобилизации организма. Именно поэтому курильщики считают, что сигареты позволяют им лучше сосредоточиться, стать более работоспособными. Недостаток норадреналина проявляется отсутствием амбиций, побуждений, а также депрессией. Вероятно, дефицитом норадреналина обусловлено то, что у курильщиков снижаются концентрация внимания и работоспособность при перерыве в курении.

Серотонин (см. выше) — нейромедиатор эмоциональной стабильности. При его дефиците у человека появляются раздражительность, недостаток положительных эмоций, бессонница. Считается, что неожиданные необъяснимые слезы, а также суицидальные мысли и действия могут быть связаны с недостатком серотонина.

Дофамин называют еще нейромедиатором удовольствия. Он вырабатывается в головном мозге, когда человек испытывает удовлетворение от происходящего. *Для выработки дофамина необходимы аминокислота фенилаланин и витамин B~6~, которые участвуют в его синтезе*. Поскольку количество этих веществ в рационе может быть ограничено, а у курильщиков происходит повышенный расход витамина B~6~, некоторые из них испытывают *хронический дефицит положительных эмоций*. Действие никотина «обманывает» организм. На самом деле повода для положительных эмоций нет, но клетки, выделяющие дофамин, получают химический сигнал

о необходимости его выделения. Курильщик действительно испытывает состояние, которое принято называть удовольствием. В результате такого никотинового «подстегивания» дофаминергических структур их способность выделять дофамин в ответ на обычные сигналы истощается.

ГАМК — один из наиболее распространенных нейромедиаторов головного мозга, который присутствует в большинстве структур и отвечает за их торможение. Поэтому психологической характеристикой, которая соответствует действию ГАМК, является спокойствие. При недостатке ГАМК человек испытывает тревогу, приступы паники. Для синтеза ГАМК необходимы глутамин и витамин B~6~.

К процессам поддержания никотиновой зависимости также могут быть причастны *глутамат*, который отвечает за активизацию клеток головного мозга, *эндорфины* (эндогенные опиоиды) и *эндогенные каннабиноиды*. Участие этих веществ в реакции головного мозга на воздействие никотина может, с одной стороны, объяснять то, что многие курильщики по-разному описывают действие курения на их состояние, а с другой — объяснять повышенную распространенность потребления нелегальных наркотиков среди курильщиков.

Психическое и физическое состояние курильщика, а также ситуация, в которой происходит курение, могут влиять на то, каким образом отдельная сигарета будет воздействовать на психологическое восприятие и физиологическую реакцию, например, она может вызвать и ощущение расслабленности, и ощущение бодрости. В стрессовых ситуациях сигарета может действовать как успокаивающее средство, а в ситуации расслабленности — как стимулятор. Такая *неоднозначная реакция* головного мозга на воздействие одного и того же вещества имеет под собой вполне определенную нейробиологическую основу. Никотинчувствительные ацетилхолиновые рецепторы в головном мозге многочисленны, расположены в различных структурах мозга, имеют множество различных типов и в зависимости от структуры и места расположения могут выполнять как стимулирующую, так и тормозящую функцию. Клинические данные свидетельствуют о том, что никотинчувствительные рецепторы задействованы в патогенезе таких заболеваний, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, синдром Туретта, шизофрения, депрессия и т.д.

Никотин стимулирует мозг, в результате чего выделяются дополнительные порции серотонина и дофамина, которые могут создавать состояния эмоциональной стабильности и удовлетворения, и у курильщиков быстро развивается привычка регулярного курения. В результате курильщики нуждаются в увеличивающемся уровне никотина, чтобы чувствовать себя «нормально», и как только содержание никотина в крови снижается ниже некоторого уровня, они испытывают желание закурить. Это острое желание заставляет курильщика испытывать стресс до тех пор, пока желание не удовлетворено. Чувство облегчения, когда это желание наконец-то удовлетворено, курильщики обычно воспринимают как «расслабление». Таким образом, потребление табака не облегчает неизбежные стрессы, а фактически вызывает дополнительные стрессы.

Согласно Международной классификации болезней 10-го и 11-го пересмотров (МКБ-10, МКБ-11), никотиновая зависимость признана *психическим расстройством*. Никотиновая зависимость является, возможно, наиболее распространенным психическим расстройством.

Как показывают исследования, те курильщики, которые отличаются выраженной зависимостью от никотина, являются принципиально иной группой по состоянию здоровья. У них более низкий уровень качества жизни, они чаще болеют, и у половины из них обнаружены признаки по меньшей мере еще одного психического расстройства.

Скорость формирования никотиновой зависимости может быть различной и зависит, согласно результатам исследований, от генетических факторов и возраста начала курения. К *генетическим факторам*, влияющим на скорость и вероятность формирования зависимости, относят как особенности функционирования ферментных систем, отвечающих за метаболизм никотина, так и биохимические особенности, предрасполагающие к развитию тех или иных психических расстройств. В пользу генетической обусловленности самой никотиновой зависимости свидетельствует, в частности, неравномерное распределение людей с никотиновой зависимостью в разных семьях. Считается, что если курение начинается в молодом возрасте, когда отдельные структуры головного мозга продолжают формироваться, развитие никотиновой зависимости более вероятно. Результаты опросов показывают, что 80% взрослых курильщиков начали курить в подростковом возрасте. Данные литературы указывают на то, что у курильщиков с большей вероятностью развивается депрессия, а те, у кого имеются признаки депрессии,

с большей вероятностью курят. Связь между курением и депрессией подчеркивается также тем фактом, что депрессия является одним из важнейших компонентов синдрома отмены никотина у курильщиков, пытающихся отказаться от курения.

Общеизвестна связь между *курением* и расстройствами, связанными со *злоупотреблением химическими веществами.* У молодых людей в возрасте 12–17 лет, которые курят, риск употребления в будущем наркотиков повышается более чем в 10 раз по сравнению со своими ровесниками, которые не курят. Люди, которые начинают курить в детском возрасте, почти в 4 раза чаще становятся регулярными потребителями наркотиков, чем те, кто не стал курильщиком в детском возрасте.

Если для начала потребления наркотиков наибольшее значение имеют социально-психологические факторы, то продолжение потребления обычно поддерживается сформировавшейся зависимостью. Здесь более важными становятся биохимические процессы формирования зависимости, и на этом пути разные химические вещества могут усугублять действие друг друга. Известно, что среди потребителей наркотиков курящих в среднем в 3 раза больше, чем среди населения в целом. При этом у потребителей нескольких наркотиков, так называемых полинаркоманов, вероятность курения оказалась в 2,35 раза выше, чем у тех, кто потреблял один нелегальный наркотик. Успешность прекращения курения у потребителей наркотиков также была в 2 раза с лишним ниже, чем среди населения в целом. Курильщики, особенно те, кто курит много, с большей вероятностью употребляют алкоголь и приобретают алкогольную зависимость, чем некурящие. Статистические данные позволяют сделать некоторые обобщения.

* У курильщиков вероятность употребления алкоголя на 30% выше, а вероятность развития алкоголизма в 10 раз выше, чем у некурящих. * От 80 до 95% всех алкоголиков являются курильщиками, а 70% всех алкоголиков выкуривают более одной пачки сигарет в день. * Начало регулярного курения обычно происходит за много лет до развития алкоголизма.

Взаимное усиление алкогольной и никотиновой зависимости может быть обусловлено различными механизмами. В частности, известно синергическое действие никотина и ацетальдегида, который является продуктом обмена этанола в организме.

6.3. Основные группы наркотических средств, психотропных и сильнодействующих веществ
6.3.1. Опиаты и опиоиды

Ученье — вот чума, ученость — вот причина,
Что нынче пуще, чем когда,
Безумных развелось людей, и дел, и мнений.
…
И впрямь с ума сойдешь от этих, от одних
От пансионов, школ, лицеев, как бишь их,
Да от ланкарточных взаимных обучений.

Александр Сергеевич Грибоедов (1795–1829),
русский поэт, прозаик, дипломат,
востоковед, пианист, композитор

По международной классификации термин «опиаты» определяет вещества, близкие по своей химической структуре к морфину, а термин «опиоиды» — вещества, оказывающие морфиноподобное действие на человека, но имеющие структуру, отличающуюся от морфина.

К опиатам относят морфин, героин, кодеин, дионин, 6–0-моноацетилморфин (6-МАМ) и другие вещества, к опиоидам — фенциклидин, метадон, фентанил, кетамин, бупренорфин и др.

Опиаты

Введение

Опий (Opium, Laudanum, Meconium) — это *высохший на воздухе млечный сок*, выделяющийся из надрезов на незрелых коробочках различных видов снотворного мака (*Papaver somniferum*), в которых в период технической (опийной) зрелости накапливается до 2,5% алкалоидов, либо *упаренный экстракт маковой соломы (экстракционный опий). И*з опия выделено свыше 20 алкалоидов, относящихся к подгруппам фенантреновых и изохинолиновых алкалоидов.

Сбор опия происходит путем надрезов головок мака на корню.

Химический состав опия: морфин (3–30%), кодеин (1–5%), тебаин (1–4%), папаверин (1–6%), носкапин (4–15%), другие алкалоиды (0,5–2%), меконовая кислота (5–10%), смолы (5–10%), жиры (1–4%), камедь и другие водорастворимые вещества (40–60%), вода (8–30%).

Наркоманы используют опий, обработанный уксусным ангидридом, — так называемый ацетилированный опий (жаргонное название — «султыга»Здесь и далее жаргонные названия наркотиков приведены в связи с тем, что они часто используются в материалах следственных дел в протоколах допросов обвиняемых или свидетелей. Указание на используемый наркотик может ускорить подтверждение или опровержение факта его присутствия в биообразцах или вещественных доказательствах.). Содержит морфин, кодеин, тебаин, ацетилкодеин, героин, моноацетилморфин. Представляет собой коричневую, темно-коричневую либо желтую жидкость с характерным запахом.

Маковая солома — Poppy Straw (синоним: кокнар, жаргонное название — «кукнар») — все части (за исключением семян) любого сорта мака, собранные любым способом, содержащие наркотически активные алкалоиды опия.

Наркотические анальгетики — производные морфина (фенантренизохинолина)*,* являются *наркотическими средствами Списка I и Списка II Перечня*.

Морфин — основной алкалоид опия (рис. 6-1) — белый кристаллический порошок, желтеющий при хранении. Морфин оказывает тормозящее влияние на условные рефлексы, понижает возбудимость дыхательного и кашлевого центров. *Медицинское применение* морфина гидрохлорид — болеутоляющее средство при травмах и различных заболеваниях, сопровождающихся сильными болевыми ощущениями (злокачественные новообразования, инфаркт миокарда и др.), при подготовке больных к операции и в послеоперационном периоде (порошки, таблетки для орального применения, ампулы для инъекций).

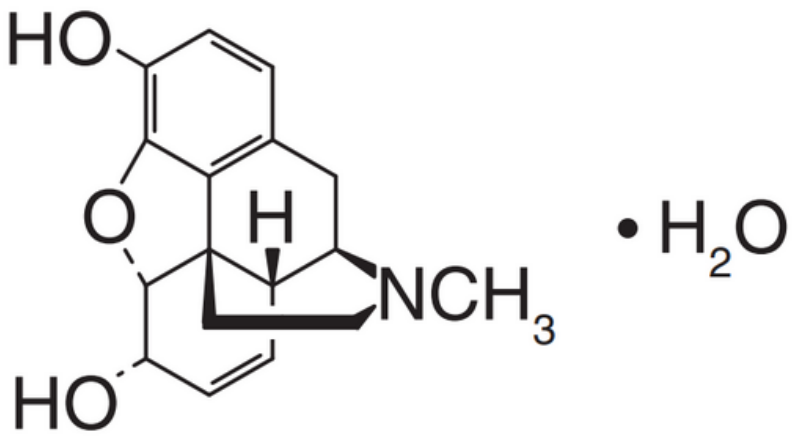


Рис. 6-1. Структурная формула морфина

Высшая разовая доза внутрь и подкожно 20 мг, высшая суточная доза 50 мг. Смертельной для человека считают дозу морфина подкожно выше 100 мг, перорально — от 300 до 1400 мг.

К морфину быстро развивается привыкание, поэтому наркоманам приходится постоянно повышать дозу, которая иногда в 100 раз и более превышает начальную.

Токсикокинетика и биотрансформация

Биодоступность морфина составляет около 20–30% при пероральном применении, так как происходит его интенсивная биотрансформация в печени и в меньшей степени — в стенке кишечника. Концентрация морфина в плазме крови (при медицинском применении) — 0,01–0,07 мкг / мл.

Токсикокинетические характеристики:

* pK~a~: 8 и 9,9; * T~1/2~: 2–3 ч; * V~d~: 3–5 л / кг; * связывание с белками плазмы крови: 25–35%; * выведение в неизмененном виде: 3–10%.

Распределение в организме: накапливается главным образом в почках, печени, легких и селезенке. Быстро покидает кровеносное русло, перераспределяясь в паренхиматозные органы — печень, почки, легкие, селезенку, мозг (в 2–5 раз выше концентрация, чем в крови), а также в скелетные мышцы и миокард. *При хроническом применении морфин накапливается в волосах и ногтях*.

Основные пути биотрансформации морфина. В реакциях N-деметилирования образуются норморфин, 3-O-метилирования — кодеин, N-окисления — N-оксид. Образование морфин-3-O- и морфин-6-O-глюкуронидов, а также 6- и 3-сульфатных конъюгатов происходит при конъюгировании с глюкуроновой и серной кислотами соответственно, причем глюкуронидов значительно больше, чем сульфатных конъюгатов. Морфин-3-глюкуронид наркотическими свойствами не обладает, морфин-6-глюкуронид проявляет значительную активность (см. рис. 6-4).

Выведение морфина и его метаболитов происходит в основном с мочой в течение 36–48 ч. До 80% введенного морфина может выделиться в течение первых 8–10 ч после введения, из них — 3% (10%) в неизмененном виде. После парентерального введения до 90% морфина выводится с мочой за 24 ч, причем 65–70% в конъюгированной форме. Также в моче присутствует незначительное количество норморфина. До 10% морфина выделяется с желчью. Через 72–80 ч в моче удается определить лишь следы морфина даже при использовании наиболее чувствительных методов.

Кодеин (3-O-метилморфин, рис. 6-2) — один из наркотически активных алкалоидов опия, получают экстракцией из растительного сырья: маковой соломы и опия.

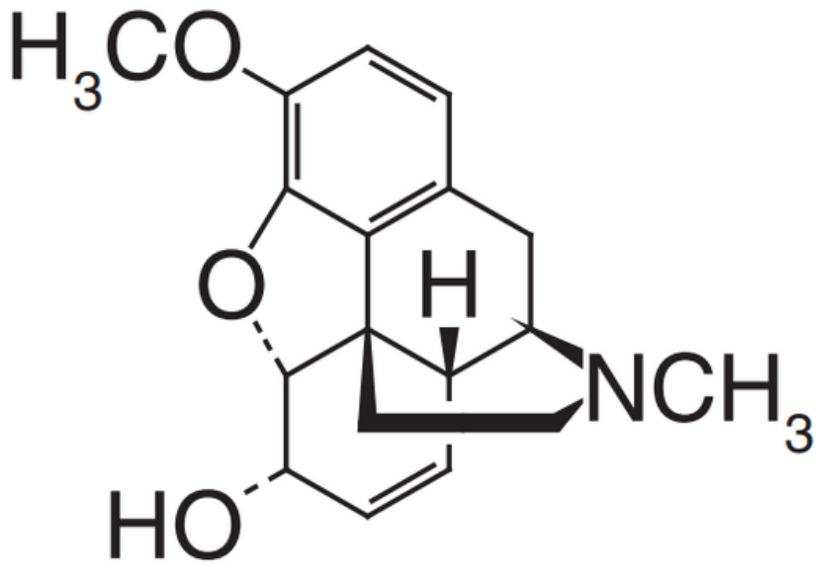


Рис. 6-2. Структурная формула кодеина

По характеру действия кодеин близок к морфину, но болеутоляющие свойства выражены слабее; сильно выражена способность подавлять возбудимость кашлевого центра. В меньшей степени, чем морфин, угнетает дыхание. Применяют главным образом для успокоения кашля. В сочетании с ненаркотическими анальгетиками, кофеином, фенобарбиталом применяется при головных болях, невралгиях. При повторном применении кодеина может развиться пристрастие.

Токсикокинетика и биотрансформация

Кодеин быстро всасывается после парентерального введения.

Токсикокинетические характеристики:

* pK~a~: 8,2; * T~1/2~: 3–4 ч; * V~d~: 2,5–3,5 л / кг; * связывание с белками плазмы крови: 7–25%; * выведение в неизмененном виде: 5–17%.

Кодеин метаболизируется в печени в результате O- и N-деметилирования соответственно до морфина или норкодеина (см. рис. 6-4).

Выведение: около 80% кодеина, принятого внутрь, выводится с мочой в виде свободного кодеина (5–17%), конъюгатов кодеина с глюкуроновой и серной кислотами (32–64%), конъюгатов норкодеина (10–21%), конъюгатов морфина (5–13%). В начальный период выведения кодеина в моче обнаруживаются в основном конъюгаты кодеина, спустя 20–40 ч их заменяют конъюгаты морфина.

К настоящему времени получено более 300 синтетических аналогов морфина, обладающих и обезболивающим, и эйфоризирующим действием. Разделить эти два эффекта пока не удалось.

В незаконном обороте наркотиков решающее значение приобретают новые более активные аналоги морфина и его полусинтетические и синтетические заменители.

Героин (диацетилморфин, рис. 6-3) является одним из самых опасных из всех известных наркотиков, так как быстро вызывает сильнейшую физическую и психическую зависимость. При ежедневном приеме героина физическая зависимость может развиться за 2 дня. Психическая зависимость развивается менее чем за 2 мес.

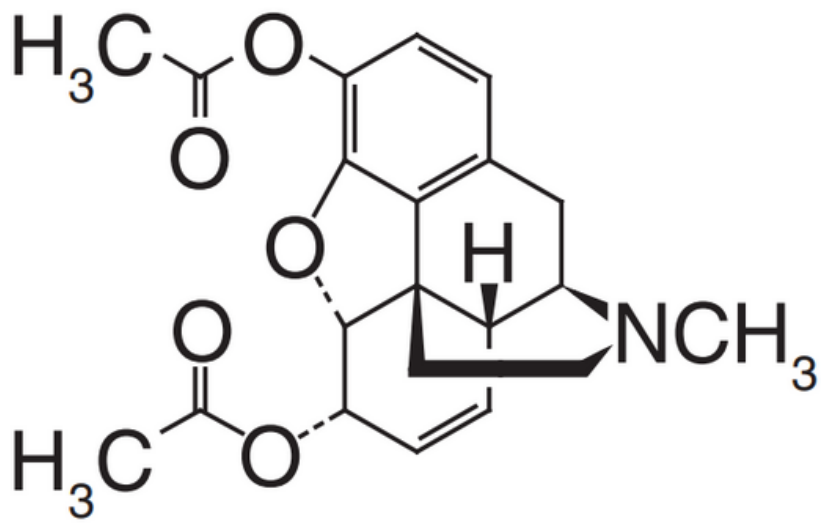


Рис. 6-3. Структурная формула героина

Чистый героин — белый порошок без запаха, горького вкуса, растворимый в воде. Максимальная доза героина для человека в лечебной практике *составляла* 5 мг, однако его *применение в медицине запрещено во всех странах.* Смертельная доза для ненаркоманов варьирует от 60 мг до 2 г.

Героин, полученный в подпольных лабораториях, может иметь различные форму (гранулы или порошок) и цвет (от белого до темно-коричневого, почти черного из-за наличия добавок: пищевых красителей, какао и коричневого сахара). Наркоманы называют героин «феррари», «белая смерть», «белый китаец» (последний представляет собой самую чистую форму — белую пудру).

Героин опасен не только тем, что быстро вызывает зависимость, но и тем, что его содержание в препаратах, находящихся в незаконном обороте, может сильно различаться. Это повышает опасность передозировки. Кроме того, «уличный» героин часто содержит ядовитые добавки, например стрихнин. «Уличный» героин редко бывает чистым и содержит около 5% героина. Остальные 95% состава приходится на различные вещества: фенобарбитал, кофеин, дифенгидрамин (димедрол), фенацетин, анальгин, новокаин, лидокаин, аспирин, антипирин, амидопирин, диазепам, анестезин, никотинамид, фенолфталеин, стрихнин, хинин, аскорбиновая, салициловая, бензойная,

фталевая и борная кислоты, наркотические средства (метаквалон, оксикодон, кокаин) и др. В состав «уличного» героина входят всевозможные наполнители: глюкоза, лактоза, фруктоза, сахароза, маннитол, крахмал, мука, хлорид натрия, карбонат кальция, сульфат бария, аморфный оксид кремния и др. Кроме того, в составе образца можно обнаружить вещества, попавшие в него из окружающей среды, например различные пластификаторы, пестициды и т.д.

Токсикокинетика и биотрансформация

Вследствие очень высокой липофильности героин и кодеин всасываются и преодолевают гематоэнцефалический барьер быстрее, чем морфин, что усиливает их воздействие на ЦНС. Достигая мозга, героин метаболизируется до морфина. В крови героин быстро превращается в 6-О-моноацетилморфин (6-МАМ) и далее в морфин (рис. 6-4).

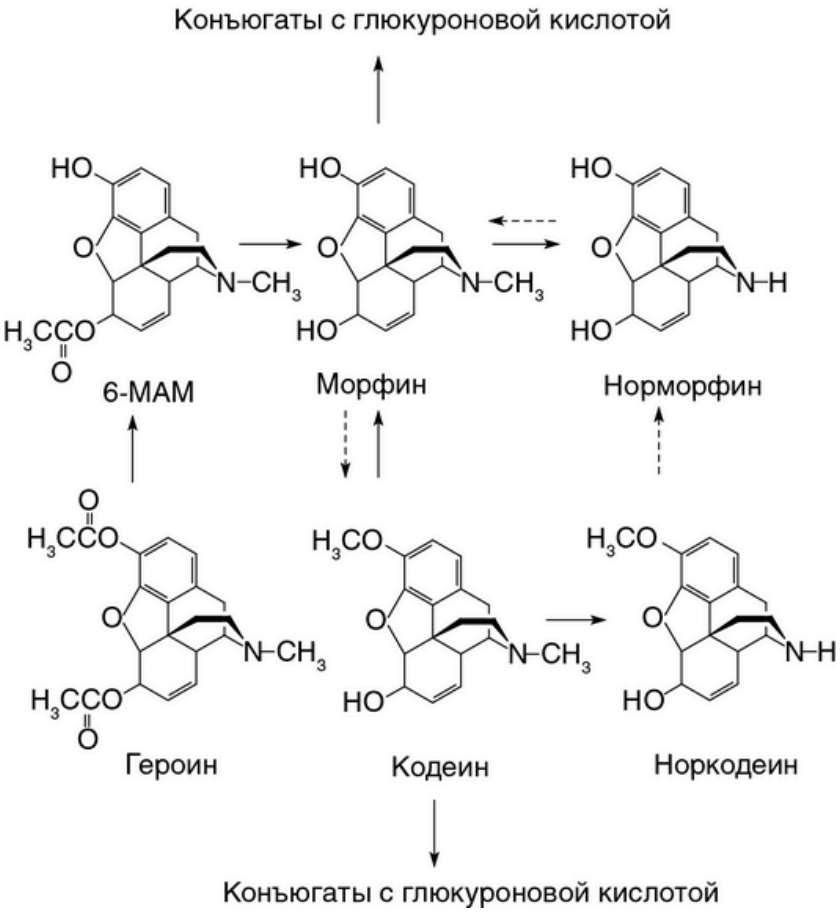


Рис. 6-4. Схема биотрансформации опиатов

Здесь и далее схемы биотрансформации наркотических средств, психотропных и сильнодействующих веществ приведены по справочной литературе: Baselt R. C. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. Foster City, CA: Biomedical publication, 2004; Clarke E. G.C., Widdop B., Moffat A. C. et al. Clarke's analysis of drugs and poisoning pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3rd ed. London: Pharmaceutical Press, 2004, и др. (см. список литературы).

Токсикокинетические характеристики:

* pK~a~: 7,6; * T~1/2~: 0,2–0,5 ч [3–5 мин (внутривенно) и 1–1,5 ч (перорально)]; * V~d~: нет данных; * связывание с белками плазмы крови: нет данных; * выведение в неизмененном виде — 0,1%.

Хотя действие героина менее продолжительно, чем морфина, оно наступает быстрее, эйфория выражена ярче, наркоманы называют ее flash (вспышка).

Основные метаболиты героина: 6-МАМ, морфин и морфин-3-глюкуронид.

6-МАМ — метаболит, обеспечивающий аналгетическое и наркотическое действие героина и *характерный только для героина*, служит *маркером* его употребления, отличающим героин от морфина и кодеина.

Распределение в организме: накапливается главным образом в почках, мозге, легких.

Выведение: до 80% дозы выделяется *с мочой* в первые 24 ч главным образом в виде морфин-3-глюкуронида, от 5 до 7% — в виде свободного морфина, 1% — в виде 6-МАМ, 0,1% — в виде неизмененного вещества.

Содержание в моче основных метаболитов морфина, героина и кодеина указано в табл. 6-2.

Таблица 6-2. Содержание основных метаболитов морфина, героина и кодеина в моче (в процентах от введенной дозы)

Исходное соединение **Метаболит**	**Морфин**	**Героин**	**Кодеин**
Морфин	2–12 (3–10)	5–7	0,1–1
Морфин-3-О-глюкуронид	65–75	50–60	5–13
Морфин-6-О-глюкуронид	0,3–35	14–16	1–2
Морфин-3-сульфат	5–10	—	—
Кодеин	—	—	5–17
Кодеин-6-глюкуронид	—	—	32–46
Диацетилморфин	—	—	—
6-О-моноацетилморфин (6-МАМ)	—	0,2–1,7 (1)	—
Норморфин	0,5–1,5	—	—
Норморфин конъюгат	3–5	—	—
Норморфин общий	—	2,8–4	Менее 1
Норкодеин	—	—	4–8
Норкодеин общий	—	—	10–20

Эффективность действия (биодоступность) опиатов обусловлена способом введения.

При внутривенном введении *героина* максимальная концентрация в плазме крови достигается мгновенно. При передозировке наркоманы иногда погибают, не закончив введение препарата (с иглой в вене).

При внутривенном введении *морфина* максимальная концентрация в плазме крови достигается за 2–15 мин, при внутримышечном — за 7,5–20 мин, при приеме внутрь — за 30–120 мин.

При внутривенном введении героина его метаболиты регистрируют в плазме крови в течение 1–2 ч (*6-МАМ*), в пределах 10–12 ч (*свободный морфин*). В моче лиц, употребляющих героин, 6-МАМ регистрируется в течение 6–8 ч, а морфин — до 48 ч и более. В случае смерти потерпевших от передозировки героина диацетилморфин, как правило, не идентифицируется в крови, но обнаруживается в моче в концентрациях до 90 нг / мл.

Токсикокинетические данные позволяют сделать следующие выводы.

* Присутствие в моче исключительно морфина и его конъюгатов указывает на употребление морфина или на злоупотребление героином одним или двумя днями ранее. * Присутствие в моче морфина, кодеина и их конъюгатов одновременно может свидетельствовать о медицинском использовании препаратов кодеина (в этом случае концентрация морфина ниже, чем кодеина). * Употребление кодеина в терапевтических дозах дает возможность обнаруживать свободный морфин или кодеин в моче только в течение нескольких часов после употребления, хотя другие метаболиты могут быть обнаружены спустя 2–3 дня после введения. * При употреблении в пищу продуктов, содержащих мак, в моче наряду с морфином и кодеином обнаруживается тебаин, что служит отличительным признаком пищевого поступлением этих продуктов в организм. * При введении в организм лекарственных препаратов, содержащих морфин или кодеин, а также при нелегальном использовании этих наркотиков тебаин в моче и в плазме крови не обнаруживается.

Симптомы острого отравления опиатами:

* цианоз; * суженные в точку зрачки; * гипотония; * спазм ЖКТ; * снижение температуры тела, влажная липкая кожа; * угнетение дыхания; * нитевидный пульс; * потеря сознания; * кома; * смерть от паралича дыхания через 2–4 ч при подкожном или пероральном введении сверхдозы и мгновенно — при внутривенном.

Методы определения опиатов

В качестве предварительных экспресс-тестов на опиаты используют хромогенные реакции с различными реактивами, в том числе наборы реактивов «Наркоспектр» для внелабораторного исследования наркотиков.

ИХМ и метод ТСХ определения опиатов обсуждались в п. 5.2 и 5.3 соответственно.

Для подтверждающего исследования и количественного определения опиатов широко используют ГХ, ВЭЖХ, КЭ, ГХ-МС, спектральные и другие методы (см. гл. 5).

Количественное определение метаболитов героина в биологических образцах проводят методом ГХ с использованием различных детекторов (ПИД, АФД, ЭЗД, масс-селективный — МС-детектор). *Во многих случаях биологические пробы перед проведением анализа подвергаются кислотному или ферментативному гидролизу, чтобы освободить морфин от остатка глюкуроновой кислоты*. Нагревание пробы мочи в течение 1,5 ч при 120 °С с добавлением 50% соляной кислоты приводит к полному разрушению конъюгатов морфина и кодеина. Кислотный и энзимный *гидролиз* может вызывать *деацетилирование* диацетил-морфина и моноацетил-морфина в морфин, поэтому для определения метаболитов героина *6-МАМ и 3-МАМ* используют пробы мочи, *не подвергавшиеся гидролизу*. Кислотный гидролиз более надежен и эффективен, чем ферментативный, но приводит к разрушению 6-МАМ.

При пробоподготовке образца для исследования методами газовой хроматографии или ГХ-МС проводят *дериватизацию* (см. гл. 4 и п. 5.3.5) *путем триметилсилилирования функциональных групп.* Метод ГХ-МС в варианте МС электронного удара широко применяют для идентификации и количественного определения опиатов. Часто используют хроматографы с квадрупольным МС-детектором или детектором типа ионной ловушки (см. п. 5.3.5). Обычно применяют кварцевые капиллярные колонки с привитыми неполярными или малополярными стационарными фазами: поперечно-сшитый метилсиликон или метил-5%фенилсиликон. Температуру термостата колонок, как правило, программируют с начальной температурой 50–150 °С до конечной 280–300 °С, со скоростью 10–50 °С/ мин. В изотермическом режиме поддерживается температура 230–240 °С. Температура инжектора 250–280 °С. Температура интерфейса 250–290 °С (чтобы не допустить конденсации компонентов пробы, температура поддерживается на 10 °С выше конечной температуры колонки).

ВЭЖХ также находит широкое применение при определении метаболитов героина, в том числе конъюгированных.

Резюме

* Обнаружение опиатов в растительном сырье, таблетках, порошке и др. проводят с помощью реакций окрашивания реактивом Марки, хлоридом железа(III) и концентрированной азотной кислотой, причем хлоридом железа(III) окрашивается только морфин и растительное сырье. Кодеин и героин этой реакции не дают. Тест с концентрированной азотной кислотой позволяет предположительно отличить героин от морфина и кодеина.
* Обнаружение опиатов в биологических образцах. Учитывая, что в неизмененном виде опиаты выделяются с мочой в малых количествах, перед проведением исследования мочу подвергают кипячению с соляной кислотой для разрушения конъюгатов, тем самым повышая концентрацию нативных соединений (однако героин при этом гидролизуется!). Для определения метаболитов героина 6-МАМ и 3-МАМ используют пробы мочи, не подвергавшиеся гидролизу.

Опиоиды

Опиоиды согласно Федеральному закону «О наркотических средствах и психотропных веществах» являются *наркотическими средствами Списка I и Списка II Перечня*.

1. Наркотические анальгетики — производные фенилпиперидина:

* группа тримеперидина (промедола) и его структурных аналогов (феноперидин, петидин); * группа фентанила и его структурных аналогов; * группа фенциклидина и его структурных аналогов.

2. Наркотические анальгетики группы бензимидазола (этонитазен).

3. Полусинтетические наркотические анальгетики группы тебаина и орипавина.

4. Наркотические анальгетики — производные разных химических структур:

* метадон и его производные; * трамадол.

6.3.2. Каннабиноиды

Лишь только дневной шум замолк,
Надел пастушье платье волк
И взял пастуший посох в лапу,
Привесил к поясу рожок,
На уши вздел широку шляпу
И крался тихо сквозь лесок
На ужин для добычи к стаду.
…
Могу вам, господа, сказать:
Кто в свете сем родился волком,
Тому лисицей не бывать.

Михаил Васильевич Ломоносов (1711–1765),
первый крупный русский ученый-естествоиспытатель,
энциклопедист, физик, химик, астроном, поэт,
основатель Московского университета

Конопля, или каннабис (*Cannabis sativa L.*) используется людьми не менее 6000 лет. Это растение, относящееся к семейству *Cannabinaceae*, произрастает в диком виде от тропических широт до регионов с умеренным климатом. Конопля представляет собой однолетний древовидный куст и может достигать четырехметровой высоты. При цветении на черешках верхних листьев выделяется смолистое вещество, которое защищает растение от солнца (так называемая смолка).

4000 лет назад в Китае коноплю стали использовать для медицинских целей (при лечении малярии, ревматизма, судорог и отсутствии аппетита), а также для получения бумаги. Популярность получаемого из конопли гашиша на Востоке была не меньше, чем алкоголя в Европе. Гашиш упоминается в Ветхом завете и в «Одиссее». Около 500 г. н.э. конопля появляется в Центральной Европе. В Средние века в Европе коноплю активно выращивали для производства морских канатов и веревок из-за их повышенной устойчивости в морской воде. В Америку коноплю завезли испанцы в XVI в.

К настоящему времени известно более 70 к*аннабиноидов,* биологически активных веществ сходного строения (рис. 6-5, 6-6), встречающихся исключительно в растении каннабис. Одно из основных действующих веществ этой группы — *тетрагидроканнабинол* (ТГК, или Δ^9^-ТГК). Содержание ТГК в растениях, полученных из разных регионов, значительно колеблется. В американских сортах конопли доля ТГК составляет менее 0,5%, в конопле, произрастающей в Колумбии, Ямайке, Мексике, — от 0,5 до 7%, Юго-Восточной Азии — до 20%.

ТГК содержится во всех частях конопли, но его наибольшее количество (до 30%) приходится на неопыленные женские растения конопли, которые называют «синсемилла». Этим же термином обозначается технология выращивания только женских растений конопли (без опыления). Много ТГК и в цветущих верхушках и листьях.

Наркотические средства, приготовляемые из растения каннабис и продаваемые на рынках, значительно различаются между собой по содержанию действующих веществ. Одна доза кустарно приготовленного препарата содержит обычно 10–30 г растительного сырья.

Наркотические средства, приготовляемые из различных частей растения каннабис

Из различных частей растения каннабис получают следующие наркотические средства:

* марихуана — верхушечные части растения каннабис с цветками или плодами, из которых не была извлечена смола; * гашиш — неочищенная или очищенная смола растения каннабис; * гашишное масло — концентрированный экстракт каннабиса или смолы каннабиса.

Марихуана (каннабис, трава конопли, «травка», «дурь», «план», «клевер», «божья травка», «сено», «Мери Джейн», «нот», «грас», «хей», «виид») — приготовленная смесь высушенных или невысушенных верхушек с листьями и остатками мелких стеблей любых сортов конопли (без центрального стебля). Употребляется как галлюциноген. Вызывает умеренную психическую зависимость. Доза марихуаны равна примерно 0,5 г.

Марихуану чаще всего курят. При употреблении марихуаны возможен так называемый flashback, когда через несколько дней после употребления марихуаны человек неожиданно снова впадает в состояние наркотического опьянения, не употребляя при этом наркотик. *Наркотически активным компонентом* марихуаны является ТГК. Содержание ТГК в марихуане составляет 0,5–5%, хотя целенаправленно выращенные сорта конопли содержат до 40% ТГК.

Цвет марихуаны в зависимости от степени высушивания и времени сбора меняется от светло-зеленого до коричневого. Марихуана имеет характерный пряный запах.

Гашиш (смола каннабиса, «анаша», «опилки», «план», «дурь», «чернушка») — специально приготовленная смесь отделенной смолы и пыльцы растения каннабис или смесь, изготовленная путем обработки (измельчение, прессование и т.д.) верхушек этого растения с различными наполнителями. Форма смеси может быть различной — таблетки, пилюли, спрессованные плитки, пасты и др.

Действие гашиша аналогично действию марихуаны. Как и марихуана, вызывает умеренную психическую зависимость. Доза гашиша равна примерно 0,15 г. Содержание ТГК в гашише равно 2–10%.

Цвет гашиша от светло-зеленого до коричневого. Имеет характерный пряный запах.

Гашишное масло («химка», масло каннабиса, «медовое масло», жидкий каннабис) — наркотическое средство, получаемое из частей растений любых видов и сортов конопли путем извлечения (экстракции) различными растворителями или жирами (может встречаться в виде раствора или вязкой массы); экстракты и настойки каннабиса. Встречается также в виде смеси с молоком и растительными маслами. Гашишное масло наносят на табак или сигареты и курят. Продукты экстракции молоком или жирами употребляют через рот.

Действие гашишного масла аналогично действию марихуаны. Как и марихуана, вызывает умеренную психическую зависимость. Содержание ТГК в гашишном масле равно 10–30%, иногда до 60%.

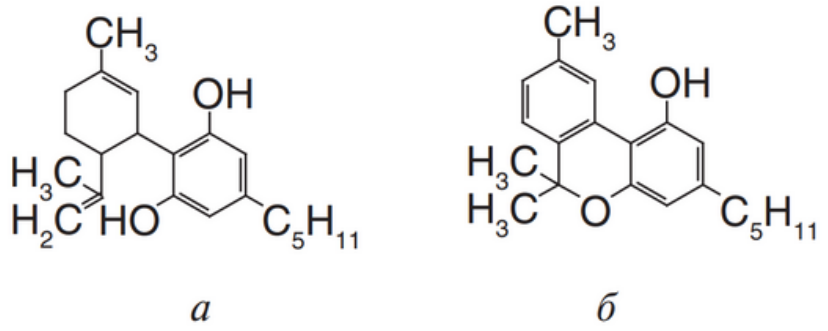
Представляет собой жидкость или вязкую массу. Цвет гашишного масла от зеленого до коричневого.

На основании Списка I Перечня марихуана, гашиш и гашишное масло отнесены к наркотическим средствам, оборот которых запрещен на территории Российской Федерации.

Наркотики из конопли не являются ни стимуляторами, ни транквилизаторами, ни галлюциногенами, ни опиоидами в полном смысле слова. Каннабиноиды могут вызывать длительный сон, как транквилизаторы, и в то же время повышать тонус, как амфетамин. В больших дозах наркотики из конопли действуют как галлюциногены, но в то же время они не обладают перекрестной толерантностью, как ЛСД, псилоцин и мескалин.

Основные действующие вещества каннабиса

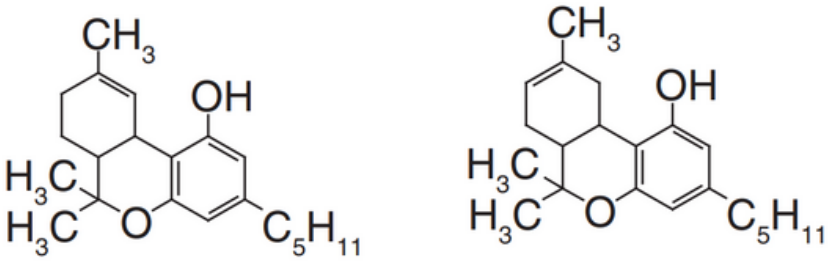
Изомеры и производные ТГК приведены на рис. 6-5 и 6-6.



а *б*

Рис. 6-5. Структурные формулы каннабидиола (*а*) и каннабиола (*б*)

Конопля содержит более 400 химических веществ, многие свойства которых до сих пор не изучены. Известно, что в состав каннабиса входят азотсодержащие вещества (аминокислоты, белки, гликопротеины), ферменты, углеводы, спирты, альдегиды, кетоны, жирные кислоты, эфиры, лактоны, терпены, стероиды, неканнабиноидные фенолы, флавоноидные гликозиды и другие классы веществ.



а *б*

Рис. 6-6. Структурные формулы (3*R*, 4*R*)(—)-*транс*-Δ^9^-тетрагидроканнабинола, или Δ^9^-ТГК (*а*) и (3*R*, 4*R*) (—) -*транс*-Δ^8^-тетрагидроканнабинола, или Δ^8^-ТГК (*б*)

Основной компонент, отвечающий за психоактивные свойства марихуаны и других препаратов каннабиса, — это Δ^9^-ТГК, но суммарный эффект их действия определяется всеми активными каннабиноидами. Δ^8^-ТГК, содержание которого гораздо ниже содержания Δ^9^-ТГК (по некоторым данным Δ^8^-ТГК в свежесобранном материале вообще отсутствует), имеет такую же активность, что и Δ^9^-ТГК.

Левовращающие изомеры Δ^9^-ТГК и Δ^8^-ТГК имеют *R*-конфигурацию хиральных центров, так же как и (3*R*, 4*R*) (—) -*транс*-Δ^9^-тетрагидроканнабиноловая кислота (Δ^9^-ТГК-кислота, или 11-нор-Δ^9^- ТГК-кислота, см. рис. 6-7), являющаяся метаболитом Δ^9^-ТГК.

Каннабинол в 10 раз менее активен, чем Δ^9^-ТГК. Каннабидиол не обладает психоактивным действием, однако вследствие его разложения (например, при курении марихуаны) возрастает количество психоактивных компонентов, действующих на организм.

Каннабинол, каннабидиол, каннабигерол, каннабихромен, каннабидиварин, каннабиварин, каннабихромин, каннабициклол, бутиловые аналоги ТГК и др. содержатся в растении в разных соотношениях в зависимости от вида сырья.

Наркотический эффект препаратов конопли может широко варьировать из-за различий между видами растений. В результате целенаправленной селекции некоторые употребляемые в настоящее время сорта растения могут содержать в 10–20 раз больше ТГК, чем конопля, которая росла 50 лет назад.

При малой дозе ТГК наступает ощущение благополучия, расслабления и некоторой дезориентации во времени. Лица, употребляющие *средние дозы* вещества, испытывают те же эффекты, только в более интенсивной форме: притупление внимания, спутанность сознания, ослабление памяти, изменение эмоционального состояния. *Большие дозы* наркотика нарушают некоторые функции организма, усиливая восприятие звуков и зрительных образов, вызывая галлюцинации. Изменение сознания может продолжаться до 2 нед, такие ощущения исчезают только

после полного выведения ТГК из организма. Длительное злоупотребление препаратами конопли приводит к снижению интеллекта и памяти.

Минимальная доза ТГК 5 мг, эффективная оральная доза 50–200 мг; эффективная доза при курении 25–50 мкг / кг. Обычно «наркотические сигареты» содержат 300–750 мг марихуаны с содержанием ТГК до 15% (в последнее время и до 40%). Средняя суточная доза — 2 «сигареты». Эффект после курения обычно длится 4–6 ч, но может продолжаться и после 24 ч.

Признаки хронической интоксикации:

* красные глаза; * чувство усталости и разбитости; * повышенный аппетит; * повышенный интерес к лекарствам; * хронический кашель; * сонливость; * частые простудные заболевания; * нарушения менструального цикла; * нарушения памяти; * трудность подбора слов при объяснении; * проблемы отношений с другими людьми; * изменение настроения от пассивности до агрессивности; * паранойя.

Каннабиноидные рецепторы. Идентифицировано *два типа* каннабиноидных рецепторов — *CB1 и CB2*. Их физиологическими лигандами являются производные арахидоновой кислоты и простагландины («эндогенные каннабиноиды»).

CB1-рецепторы располагаются в центральной и периферической нервной системе, наиболее высокая их плотность наблюдается в ганглиях головного мозга. Главный эффект возбуждения CB1-рецепторов связан с уменьшением выделения медиаторов — дофамина, норэпинефрина и серотонина, что объясняет противорвотное действие каннабиноидов и их влияние на эмоциональное состояние, двигательную активность, регулирование аппетита и боли.

CB2-рецепторы ответственны за иммуномодулирующие эффекты каннабиноидов и расположены в тканях, выполняющих в организме человека иммунологические функции (лейкоциты крови, костный мозг, селезенка, вилочковая железа, миндалины, макрофаги и мастоциты).

Физические свойства

Δ^9^-ТГК и Δ^8^-ТГК — маслянистые жидкости, имеют температуру кипения соответственно 200 и 210–213 °С. Хорошо растворяются в этаноле, ацетоне. Растворимость Δ^9^-ТГК в воде 3 мг / л. Ограниченно растворяются в хлороформе и диэтиловом эфире и практически нерастворимы в бензоле, петролейном эфире.

Токсикокинетика и биотрансформация

Каннабиноиды активно абсорбируются из ЖКТ (90–95%), но из-за эффекта первого прохождения через печень (см. гл. 3) биодоступность при оральном приеме составляет только 5–20% и концентрация Δ^9^-ТГК в крови нарастает медленно, достигая максимальных значений через 1,5–4 ч. При курении каннабиноиды всасываются за несколько минут, при этом возрастает количество физиологически активных компонентов вследствие разложения *каннабидиола*. Максимальные концентрации Δ^9^-ТГК в плазме крови наблюдаются в пределах 1–2 мин после внутривенного или ингаляционного приема. Индивидуальные особенности потребителя наркотика приводят к изменению биодоступности препарата (см. гл. 3).

Фармакологические эффекты каннабиноидов не коррелируют с их максимальной концентрацией в плазме крови и наступают обычно с задержкой 15–60 мин после достижения этой концентрации.

Характерной особенностью Δ^9^-ТГК является способность к кумуляции. Δ^9^-ТГК имеет большой объем распределения (4–14 л / кг), и 97% его метаболитов в плазме интенсивно связываются с липопротеинами и значительно меньше — с альбуминами. Как липофильные вещества, каннабиноиды быстро перераспределяются из плазмы в хорошо снабжаемые кровью ткани и пересекают гематоэнцефалический барьер. Перераспределение наркотика приводит к его *накоплению в жировых тканях*.

T~1 / 2 ~различается у лиц, относительно редко и часто потребляющих наркотик, и сильно зависит от индивидуальных особенностей организма.

Токсикокинетические характеристики Δ^9^-ТГК:

p*Ka*: 10,6;

T~1 / 2~: 20–57 ч для относительно редко потребляющих и 3–14 ч для часто потребляющих;

V~d~: 4–14 л / кг;

связывание с белками плазмы крови 65–70%;

выведение в неизмененном виде менее 1%.

Биотрансформация каннабиноидов осуществляется системой цитохрома *P*450 печени (рис. 6-7). Δ^9^-ТГК подвергается интенсивной биотрансформации в микросомах печени (обнаружено около 50 метаболитов), образуя гидроксилированные производные. *Основным активным метаболитом в плазме* крови является продукт окисления по C~11~–11-гидрокси-Δ^9^-ТГК, а *в моче* — продукт окисления 11-гидрокси-Δ^9^-ТГК —11-нор-Δ^9^- ТГК-кислота (Δ^9^- ТГК-кислота). При курении или внутривенном введении большая часть Δ^9^-ТГК-кислоты в крови находится в свободном состоянии. Биологической активностью обладают 11-гидрокси-Δ^9^-ТГК и 8β-гидрокси-Δ^9^-ТГК.

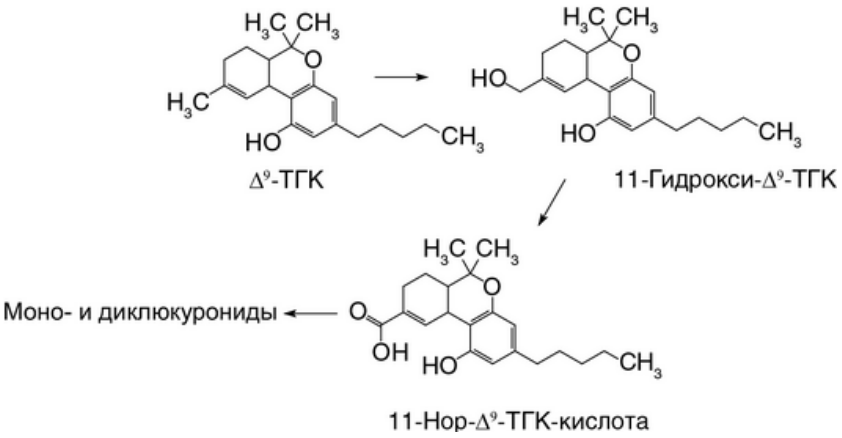


Рис. 6-7. Схема биотрансформации Δ^9^-ТГК

Выведение. Δ^9^-ТГК и его основные метаболиты выводятся из организма главным образом с фекалиями и мочой. Для Δ^9^-ТГК примерно 80–90% дозы выводится за 5 дней после приема, причем около 20% экскретируется с мочой и *65% — с калом*. С мочой каннабиноиды выводятся в виде метаболитов, основным из которых является Δ^9^-ТГК-кислота (Δ^9^-ТГК-COOH), на 80% связанная с глюкуроновой (в виде моноглюкуронида и, возможно, диглюкуронида, хотя по некоторым данным фенольная группа Δ^9^-ТГК-COOH конъюгированию не подвергается) и серной кислотами.

8β, 11-дигидрокси-Δ^9^-ТГК выделяется в мочу в интервале около 24 ч после курения и может служить маркером недавнего потребления марихуаны. Максимум концентрации приходится на период 1–4 ч, затем снижается до 20–10 нг / мл в интервале 4–6 ч. В моче после гидролиза может быть обнаружен метаболит 8β, 11-дигидрокси-Δ^9^-ТГК-глюкуронид: уровень более 15 нг / мл указывает на вероятное потребление марихуаны *не более чем за 6 ч до отбора образца*.

Присутствие следовых количеств каннабинола в моче объясняется его образованием из Δ^9^-ТГК при курении в результате термического превращения и как компонента каннабиса.

Каннабидиол гидроксилируется, окисляется и выводится в мочу в виде многочисленных гидрокси- и карбоксипроизводных.

Итак, с мочой выводятся следующие метаболиты.

Основной метаболит:

* Δ^9^-ТГК-COOH-глюкуронид (Δ^9^-ТГК-COOH-диглюкуронид).

В меньшем количестве:

* Δ^9^-ТГК-СООН свободный; * 11-гидрокси-Δ^9^-ТГК-глюкуронид и 11-гидрокси-Δ^9^-ТГК свободный; * 8β-гидрокси-Δ^9^-ТГК; * 8β, 11-дигидрокси-Δ^9^-ТГК-глюкуронид и 8β, 11-дигидрокси-Δ^9^-ТГК свободный; * Δ^9^-ТГК-глюкуронид и Δ^9^-ТГК свободный;

*В следовых количествах***:**

* каннабинол; * каннабидиол.

С фекалиями в большей степени выводятся конъюгированные с желчными и жирными кислотами Δ^9^-ТГК и Δ^9^-ТГК-СООН.

После употребления разовой дозы низкие концентрации метаболитов Δ^9^-ТГК могут быть обнаружены в моче в течение 5 нед.

Степень выведения Δ^9^-ТГК зависит от дозы и путей введения. Выведение метаболитов происходит не только с мочой и калом, но и *с секретом слюнных и молочных желез.* Слюна по некоторым критериям является лучшим биологическим объектом при доказательстве факта недавнего потребления марихуаны.

При хроническом потреблении Δ^9^-ТГК депонируется в жировой ткани.

Методы определения

Метод ТСХ из-за низкой чувствительности для определения Δ^9^-ТГК-СООН непригоден. Кроме того, Δ^9^-ТГК-СООН не дает характерных для ТГК реакций окрашивания.

ИХМ определяют Δ^9^-ТГК-СООН и другие метаболиты.

С помощью ИФА можно обнаружить в моче постоянных потребителей 20 нг / мл каннабиноидов (в среднем) в течение 1 мес, а в моче непостоянных потребителей — в течение 15 дней (от 3 до 28 дней) после последнего употребления (см. п. 5.2).

Вследствие высокой липорастворимости каннабиноидов и их низкой концентрации в моче и крови содержание каннабиноидов часто устанавливают в смывах рук и ротовой полости подозреваемых. *Обнаружение каннабиноидов только в смывах не является подтверждением того, что данное лицо употребляло марихуану.*

При исследовании плазмы крови надежные результаты по обнаружению ТГК получаются после добавления к плазме ацетонитрила (или метанола) и последующей экстракции толуолом. Для очистки от сопутствующих кислот и жиров используют *реэкстракцию* или *ТФЭ* на ионообменниках и патронах. В последнем случае даже при исследовании жировых тканей возможно выделение до 80% ТГК. Кислые метаболиты ТГК находятся в моче в виде глюкуронидов, которые легко гидролизуются в щелочной среде (в течение 15 мин при комнатной температуре или в течение 5 мин при 50 °С). При ТФЭ кондиционирование колонки (фаза С18) проводят медленно порциями метанола по 3 мл и водой. Через колонку пропускают гидролизированный образец (2 мл / мин) и промывают 10 мл 0,1 М HCl и 25 мл фосфорной кислоты в 10% ацетонитриле. Элюируют каннабиноиды 1 мл ацетона и упаривают под током азота. Сухой остаток растворяют в 100 мл метанола.

В криминалистическом анализе растительные препараты и сырье каннабиса *обязательно* исследуют с помощью светооптической микроскопии. Для выявления характерных морфологических признаков готовят препараты из растительного сырья (марихуана, гашиш) в водно-глицериновой смеси по стандартной методике и исследуют их при увеличении в 400 раз с помощью светооптического микроскопа.

Морфологические особенности растения рода конопли:

* простые одноклеточные волоски ретортообразной формы с цистолитами и без них; * сидячие одноклеточные волоски; * железки с числом выделительных клеток 8–12; * сфероидальные пыльцевые зерна с тремя порами.

Для обнаружения цистолитов в растительном сырье на препарат, помещенный на предметное стекло, наносят каплю воды и каплю соляной кислоты. При этом выделяются пузырьки углекислого газа, которые хорошо видны. Хна (возможная примесь каннабиса) такую реакцию не дает.

Реакции окрашивания. Обработка раствором Дюкенуа–Левина (0,4 г ванилина в 20 мл 95% этанола с последующим добавлением 0,5 мл ацетальдегида; концентрированная соляная кислота и хлороформ). К небольшому количеству образца добавляют около 2 мл реактива и встряхивают в течение 1 мин. Затем добавляют 2 мл концентрированной HCl, встряхивают несколько секунд и оставляют на 5 мин. Если окраска начинает развиваться через 1–2 мин, добавляют 2 мл хлороформа и осторожно встряхивают смесь. При наличии каннабиноидов наблюдают сине-фиолетовое окрашивание нижнего хлороформного слоя. Можно использовать и другие хромогенные реакции с различными реактивами, в том числе наборы реактивов «Наркоспектр» для внелабораторного исследования наркотиков.

Метод ТСХ обычно *применяют при исследовании смывов с пальцев рук, ладоней, губ, полости рта,* т. е. в местах, где конденсируются продукты курения. Смывы производят с помощью ватного или марлевого тампона, смоченного этиловым спиртом. Из материала тампона каннабиноиды экстрагируют органическим растворителем — этилацетатом, гексаном, петролейным эфиром или смесью хлороформ–метанол (2:1), центрифугируют и наносят полученные экстракты на пластину с силикагелем. Хроматографическое разделение проводят двукратно в толуоле либо в системе петролейный эфир — диэтиловый эфир (4:1). После завершения разделения пластину высушивают и обрабатывают 0,1 или 0,5% раствором реактива прочного синего Б или ББ в 10% растворе гидрокарбоната натрия. При этом на пластине, разделение на которой было выполнено в толуоле, появляются соответственно окрашенные хроматографические зоны каннабиноидов: каннабидиола (зона поглощения оранжевого цвета — *R~f~* 0,76), ТГК (зона поглощения красного цвета — *R~f~* 0,66), каннабинола (зона поглощения красно-фиолетового цвета — *R~f~* 0,55), каннабихромена (зона поглощения красно-оранжевого цвета — *R*~f ~0,51).

Каннабиноиды можно идентифицировать с помощью УФ- и ИК-спектрометрии. Спиртовой раствор Δ^9^-ТГК имеет характерный УФ-спектр с максимумами поглощения соответственно 283 и 276 нм.

УФ- и ИК-спектры Δ^9^-ТГК представлены на рис. 6-8.

При исследовании плазмы крови на присутствие Δ^9^-ТГК-СООН часто применяют метод ГХ-МС, который позволяет в пробе объемом от 4 до 10 мл обнаруживать 1–10 нг / мл Δ^9^-ТГК-СООН. Такие пределы обнаружения адекватны большинству судебных случаев. Однако после приема разовой дозы концентрация Δ^9^-ТГК в крови в течение уже первых часов ниже 1 нг / мл.

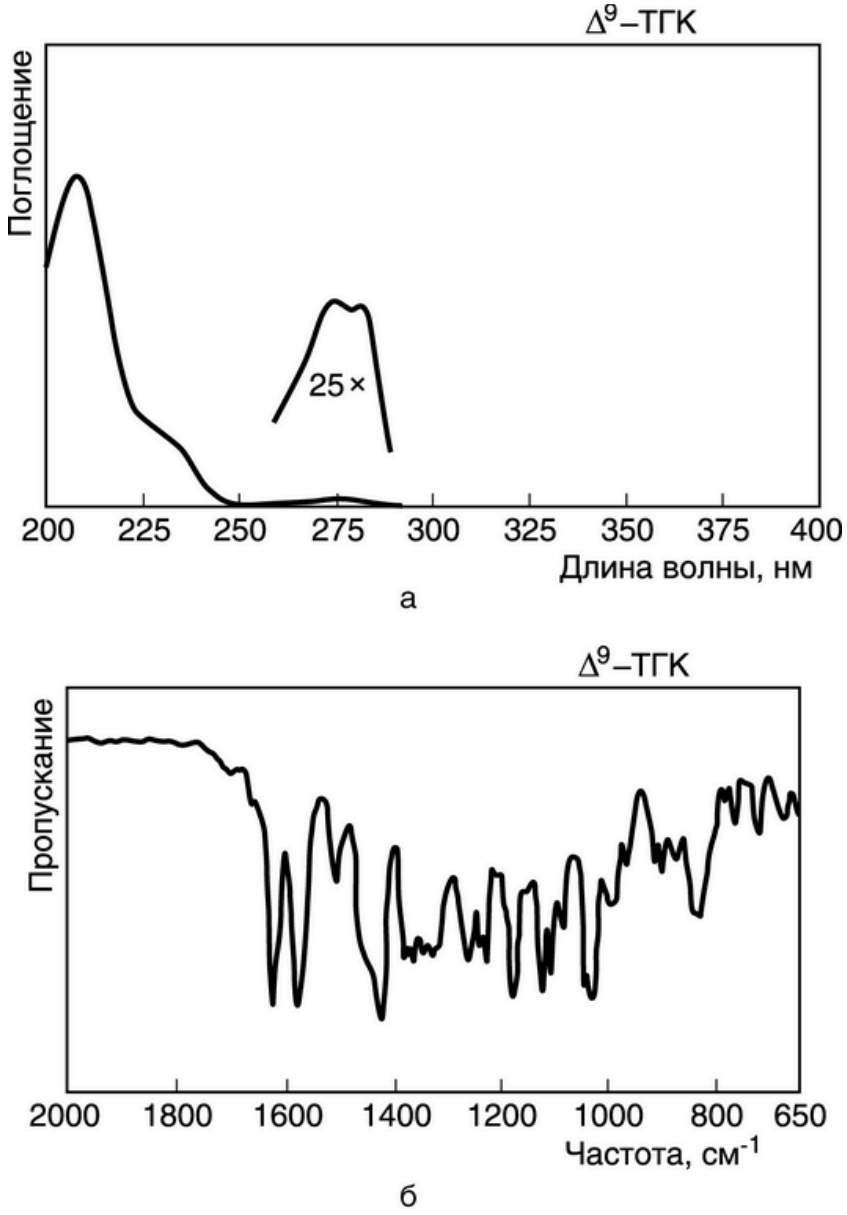


Рис. 6-8. УФ- (*а*) и ИК-спектры (*б*) Δ^9^-ТГК

После приема 5–20 мг наркотика концентрация Δ^9^-ТГК в слюне достигает 1000 нг / мл и хорошо коррелирует с динамикой физиологических эффектов, а через 3 ч концентрация в слюне снижается до 50 нг / мл, что сегодня можно детектировать методом ГХ-МС.

Для применения методов ГЖХ, КЭ, ВЭЖХ и ГХ-МС при определении каннабиноидов надо иметь внутренние стандарты, например оксифенбутазон, кетопрофен, дейтериевые аналоги Δ^9^-ТГК-СООН (для ГХ-МС), *п*-октил — *п*-гидроксибензоат (для ВЭЖХ) и проводить дериватизацию, например силилирование BSTFA или MTBSTFA (см. гл. 4 и 5).

В табл. 6-3 приведены условия определения каннабиноидов различными методами.

Таблица 6-3. Условия определения каннабиноидов методами ГЖХ, ВЭЖХ, ГХ-МС

ГЖХ	**ВЭЖХ**	**ГХ-МС**
Детектор: ПИД Колонка: кварцевая колонка 10 м × 0,52 мм I. D. с 2,6 мкм Упаковка: 3% диметилсиликон (OV-l)	Колонка: стационарная фаза Octylsilica (Zorbax C8, или эквивалент), 5 мкм, 25 см × 4,6 мм; подвижная фаза: ацетонитрил — 50 мМ фосфорной кислоты (65:35,	Детектор: МСД Колонка: кварцевая колонка 10–30 м × 0,18–0,25 мм I. D с 0,25 мкм Упаковка: фенилметил или диметилсилоксан Газовая смесь: гелий (скорость 2 мл / мин) Техника ввода: splitless

Газовая смесь: гелий (скорость 2 мл / мин)	по объему). Скорость потока: 1,5 мл / мин.	Температура: инжектор 250–260 °C
Техника ввода: Split / splitless	Обнаружение:	колонка от 150–220 до 270–290 °C
Температура:	УФ λ = 211 нм (диодноматричный	по 5–25 °C/ мин
инжектор 290 °C	детектор 200–350 нм, режим	Внутренний стандарт: меклофенамовая
колонка 240 °C	сканирования).	кислота или дейтерированное производное
детектор 290 °C	Объем ввода: 5–10 мкл.	Δ^9^-ТГК-кислоты
	Внутренний стандарт: каннабинол	

В волосах методом ГХ-МС каннабиноиды обнаруживают в концентрации 0,1–0,29 нг / мг (рис. 6-9).
Для доказательства факта употребления продуктов каннабиса по анализу волос надежнее определять метаболит Δ^9^-ТГК-СООН, чем Δ^9^-ТГК, из-за возможности загрязнения волос вследствие пассивного курения.

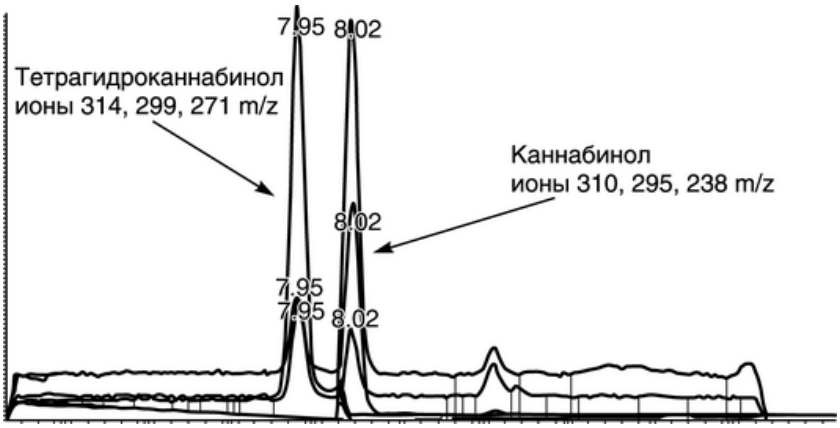


Рис. 6-9. Обнаружение каннабиноидов в волосах методом ГХ-МС

Заключение

При определении каннабиноидов в качестве подтверждающих методов используют ГХ, ВЭЖХ, ГХ-МС.

МС основных компонентов каннабиса:

каннабидиол: 231, 246, 314, 232, 121, 193,74,174 *m / z*;

каннабинол: 295, 296, 238, 310, 119, 43, 251, 239 *m / z*;

Δ^9^-ТГК: 299, 231, 314, 43, 41, 295, 55, 271 *m / z*.

6.3.3. Фенилалкиламины

А ведь даже Дьявол (Иблис) в мусульманской
поэзии говорит: «Меня рисуют в банях таким
безобразным, потому что кисть — в ладони моего врага».

Лев Николаевич Гумилев (1912–1992), выдающийся советский и российский ученый, писатель, этнолог, археолог, востоковед, переводчик, историк, географ, философ, создатель пассионарной теории этногенеза

Неправильное знание хуже, чем незнание…
Плохой учитель преподносит истину,
а хороший — учит ее находить.

Фридрих Адольф Дистервег (1790–1866), выдающийся немецкий педагог, учитель физики и математики средней школы

Фенилалкиламины — это вещества растительного и синтетического происхождения, давно известные человеку и широко применяемые как с медицинскими, так и другими целями.

Существует несколько классификаций фенилалкиламинов:

* по химическому строению; * фармакологическому действию; * источникам получения и происхождению.

Основные типы фармакологического действия:

* стимулирующее ЦНС; * галлюциногенное; * бронхорасширяющее; * подавляющее аппетит.

Наркотическое опьянение препаратами этой группы в целом характеризуется рядом изменений в соматической, вегетативно-неврологической и психической сферах:

* резкое повышение артериального давления, учащение дыхания, сердечная аритмия, в частности преждевременное сокращение желудочков сердца; * тремор, озноб, головокружение, повышенная потливость, гиперрефлексия, резко расширенные зрачки, резкое снижение аппетита, бессонница; * ощущение притока энергии, веселость, оживление, болтливость, раздражительность, беспокойство, тревога, агрессивное поведение, стремление все время находиться в движении, стереотипия (многочасовые, монотонные действия), при передозировке — галлюцинации, психотические расстройства и пр.

Характер, длительность и степень проявления указанных выше симптомов определяются химической структурой вещества, его дозой и индивидуальными особенностями потребителя наркотиков.

Стимуляторы ЦНС увеличивают уровень катехоламинов в синаптическом пространстве, блокируя обратный захват норадреналина и дофамина пресинаптическими нейронами и высвобождая указанные нейромедиаторы, а также ингибируют различные моноаминооксидазы**.** Не обладая сродством к адрено- и дофаминовым рецепторам, они увеличивают высвобождение серотонина, что (по существующей теории) объясняет эффекты этих наркотиков, связанные с поведенческой реакцией.

Правовращающие энантиомеры амфетаминов в 5 раз более активны как стимуляторы, чем их левовращающие аналоги.

Абстинентный синдром. Фенилалкиламины не дают выраженных проявлений физической зависимости, но при резком прекращении приема **(**после длительного применения) возникает абстиненция.

При резком прекращении приема:

* стойкая бессонница, депрессия с идеями самообвинения, иногда с суицидальными тенденциями.

Лишение стимуляторов:

* психоз, расстройства сна, помрачнение сознания, двигательное возбуждение, в некоторых случаях преобладают бредовые идеи преследования, галлюцинации.

Хроническая интоксикация характеризуется выраженной *психической* зависимостью, иногда очень интенсивной.

Хроническая интоксикация приводит:

* к общему истощению, заметному падению массы тела, вегетососудистым нарушениям, бессонице, тахикардии, аритмии, гипертонии, раздражительности, возбудимости, патологическому изменению личности; * к снижению интеллекта, патологической обстоятельности мышления, зацикливанию на несущественных деталях, сужению круга интересов.

Фенилалкиламины природного происхождения

Что снаружи и что внутри — это еще вопрос.

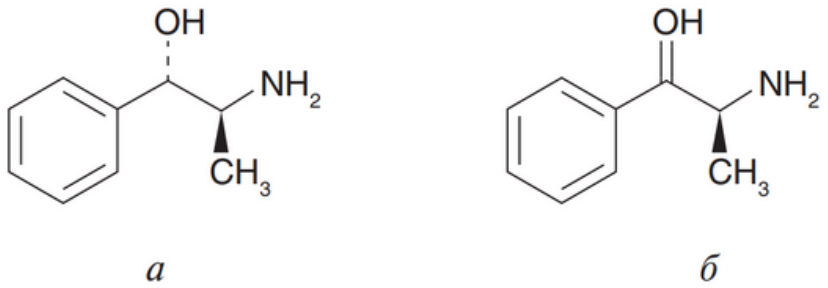
Рене Магритт (1898–1967), известный бельгийский художник-сюрреалист

Фенилалкиламины природного происхождения содержатся в таких растениях, как эфедра, кат съедобный, пейот и некоторых других.

Кат съедобный (*Catha edulis*)

Первые упоминания о кате относятся к XV столетию н.э. Молодые побеги и листья вечнозеленого кустарника *Catha edulis*, произрастающего на юге Аравийского полуострова и в Восточной Африке, используются населением этих регионов в качестве возбуждающего, стимулирующего и эйфоризирующего средства. Высушенные листья этого растения известны как абиссинский или арабский чай.

Зеленые свежие листья содержат алкалоид катин, при пероральном применении вызывают эйфорию и галлюцинации. При их хранении в течение 3–4 дней катин под действием ферментов окисляется до катинона. Катин и катинон являются действующим началом ката съедобного. Катин и катинон относятся к психотропным веществам Списка I Перечня.



а *б*

Рис. 6-10. Структурные формулы катина (*а*) и катинона (*б*)

В дальнейшем на основе этих химических соединений был представлен огромный класс наркотических средств.

Трава эфедры (*Ephedrae herba*)

Род эфедра имеет более 40 видов и довольно широко распространен в областях с сухим климатом, главным образом в Средиземноморье, в Азии, западной части Северной Америки и в Южной Америке. Виды эфедры представляют собой более или менее ксерофильные и полуксерофильные растения, в большинстве случаев это низкие (30–40 см), сильно ветвистые кустарники. Прутьевидные членистые ветки расположены в мутовках, с кожистыми влагалищами возле узлов и лишены зеленых листьев.

Общее содержание алкалоидов в зависимости от вида эфедры составляет 0,6–1,75%, причем на долю эфедрина приходится 85–90%, псевдоэфедрина —10–15%.

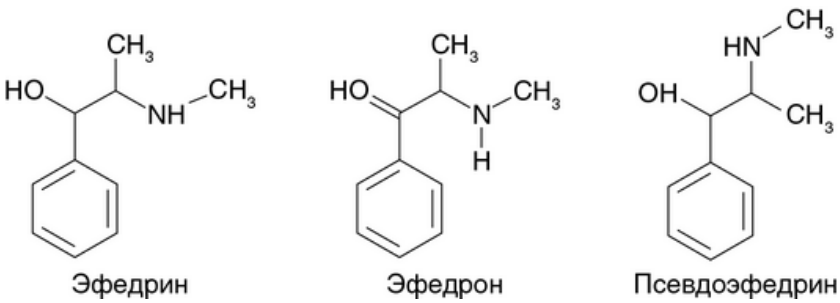


Рис. 6-11. Структурные формулы эфедрина, эфедрона и псевдоэфедрина

Эфедрин получают извлечением из слегка подщелоченного мелкоизмельченного растительного сырья *Ephedrae herba* органическими растворителями или подкисленной водой.

Разделение эфедрина и его диастереоизомера — псевдоэфедрина основано на различной растворимости их оксалатов в спирте.

В настоящее время эфедрин получают преимущественно синтетически.

Эфедрин, псевдоэфедрин и их соли включены в Список IV Перечня, эфедрон — в Список I Перечня.

Эфедрон — наркотическое средство, под действием которого быстро *формируется психическая зависимость*. Эфедрон получают кустарным способом из эфедрина путем окисления гидроксигруппы в молекуле эфедрина до карбонильной, используя в качестве окислителя перманганат калия.

Токсикокинетика и биотрансформация

Токсикокинетические характеристики:

* pKa 9,4(катин); 8,0(катинон); * T ~½ ~— 3 ч (катин); 2,7—6 ч (катинон); * Vd — нет данных; * связывание с белками плазмы крови — нет данных; * выведение в неизмененном виде — 40% (катин); нет данных (катинон).

Биотрансформация: реакции деметилирования, окислительного деаминирования и конъюгации. Биотрансформация катинона аналогична биотрансформации эфедрина.

Токсикокинетические характеристики эфедрина и его производных приведены в табл. 6-4.

Таблица 6-4. Токсикокинетические характеристики эфедрина и его производных

Вещество	pK~a~	Vd, л/кг	T~1/2~, ч	Основные метаболиты, %	Выведение в неизмененном виде, %
Эфедрин	9,6	—	3–11	Норэфедрин — 8–20 Бензойная и гиппуровая кислоты, фенилпропандиол — 4–13	55–75
Псевдо-эфедрин	9,8	2–3	3–16	Норпсевдоэфедрин (катин) — около 1	90
Эфедрон	7,15	—	3–8	Норпсевдоэфедрин — 50–60 Норэфедрин — менее 2	15–20

При оральном применении эфедрин быстро абсорбируется. Максимальная концентрация в крови при пероральном приеме достигается через 1 ч (табл.6-5).

Таблица 6-5. Концентрация эфедрина и его производных в плазме крови

Вещество	Концентрация в плазме, мкг/мл	
	терапевтическая	токсическая
Эфедрин	0,035–0,08	0,15–10,0
Норэфедрин	0,05–0,12	До 50,0
Эфедрон	—	0,2–30,0

Биотрансформация эфедрина: реакции деметилирования, окислительного деаминирования и конъюгации.

Кактус пейот (*Lophophora williamsii*)

В настоящее время известны около 10 родов семейства кактусовых (*Cactaceae*), содержащих галлюциногенный алкалоид мескалин: род *Gym-nocalycium*, вид *gibbosum* (родина Аргентина) и *leanum* (родина Аргентина и Уругвай); род *Islaya*, вид *minor* (родина Юг Перу); род *Lophophora* вид *diffusa* (*Peyote*, родина Мексика) и *Williamsii* (*Peyote*, *Mescal*, etc. — классический пейот, растущий в Северной и Центральной Мексике и юге штата Техас, США); род *Opuntia* (от юго-запада США до центральной Мексики), род *Pelecyphora aselliformis* (Мексика), род *Pereskia* (Мексика), род *Stetsonia* вид *coryne* (Аргентина), род *Trichocereus* вид *cuzcoensis* (Перу), *fulvianus* (Чили), *macrogonus* (Южная Америка), *pachanoi* (San Pedro) (родина — Перу, Эквадор), *peruvianus* (Перу), род *Scopulicola* (Боливия, Аргентина).

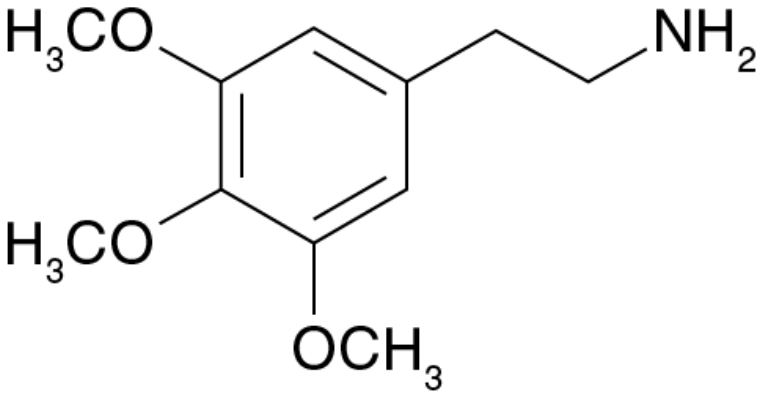


Рис. 6-12. Структурная формула мескалина

Мескалин (3,4,5-триметоксифенилэтиламин) является аналогом *амфетамина* по структуре и действию.

Эффекты пейота проявляются у человека после употребления нескольких пастилок или верхушек кактуса *Lophophora williamsii*, и приводят к стимуляции умственной активности и появлению визуальных галлюцинаций. *Интоксикация* проявляется вначале активной деятельностью и состоянием гиперчувствительности с последующим периодом успокоения и мускульного расслабления, в течение которого возникают цветные видения.

После приема *per os* мескалина в дозе 200–400 мг (что соответствует 10–25 г высушенного пейота или 50–200 г свежего кактуса *San Pedro*) препарат вызывает у человека типичный для психотомиметиков галлюцинаторный синдром. Первые признаки действия мескалина проявляются позже, чем при употреблении ЛСД, часто даже не ранее чем через 3 ч, но зато они длятся дольше — в среднем около 12 ч, а последействие сохраняется в течение 2 нед после однократного приема. Галлюцинациям предшествуют судороги, тошнота, потливость, озноб, страх и расширение зрачков. Позже начинаются зрительные и слуховые галлюцинации, усиленные ощущением нереальности происходящего и одновременно восхищающие наблюдателя. В исключительно высоких дозах мескалин может привести к смерти в результате паралича дыхательного центра. Так же как и другие психоделические наркотики, мескалин вызывает толерантность. Развивается психическая зависимость, но физическая зависимость отсутствует.

Полный спектр эффектов, наблюдаемых от воздействия мескалина, служит моделью химически обусловленного психического расстройства. Галлюциногенные свойства мескалина таковы, что этот наркотик считают *стандартом, относительно которого изучаются свойства других галлюциногенов.*

В настоящее время *в незаконном обороте* этой группы основное место занимают растительные наркотики, содержащие мескалин, а также мескалин и его производные, полученные синтетическим путем.

Токсикокинетика и биотрансформация

Быстро абсорбируется после орального приема. Концентрации в плазме через 2 и 7 ч после перорального приема составляют 3,8 и 1,7 мг/л соответственно.

Токсикокинетические характеристики:

* pKa 9,6; * T ~½ ~— 6–12 ч; * Vd — нет данных; * связывание с белками плазмы крови — нет данных; * выведение в неизмененном виде — 50–60 %.

Синтетические фенилалкиламины

Эти люди не жили заветами Дарвина, Маркоса…
Канта, Толстого, но жили заветами — начхать и наврать…

Андрей Белый
(Борис Николаевич Бугаев, 1880–1934)
известный русский писатель, поэт, критик,

математик, один из ведущих деятелей
русского символизма и модернизма

В России количество изымаемых фенилалкиламинов, в частности амфетаминов, в последние годы растет стремительными темпами. К синтетическим фенилалкиламинам относят:

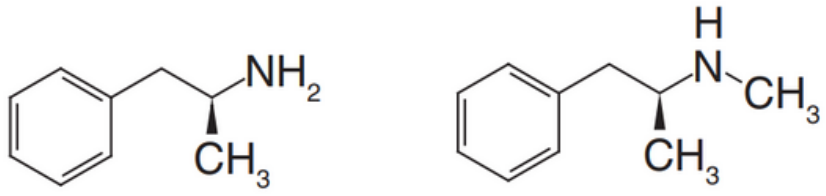
* амфетамин; * метамфетамин; * метоксизамещенные по бензольному кольцу фенилалкиламины; * метилендиоксипроизводные фенилалкиламинов.

В незаконном обороте наркотиков получили распространение более 20 синтетических фенилалкиламинов. Из них наиболее часто встречаются МДАПолностью названия веществ приведены в табл. 6-18. (Love Drugs), МДМА (Ecstasy, XTC, Adam, ESSENCE, Cardillac), МДЕА (Eve, МДЕ), ДОМ (STP), ПМА, ДМА, ТМА, ДОБ, ДОХ, МБДБ, БДБ, ДОЭТ, 2-СВ и др. Хотя в России до настоящего момента зафиксированы случаи употребления только некоторых из них (МДА, МДМА, МДЕА, МБДБ, ДОБ, 2-СВ), все упомянутые фенилалкиламины внесены в Перечень.

Амфетамин (рис. 6-13, *а*), впервые синтезированный в 1887 г. как аналог эфедрина, получил широкое распространение в медицине в качестве бронхорасширяющего средства. В 20–30-е годы XX в. стал использоваться как стимулятор ЦНС, для подавления аппетита, лечения гипокинезии и нарколепсии. Основными и тяжелейшими последствиями приема являются увеличение вероятности инсульта, гипертония, аритмии, параноидальные психозы.

Оральная или внутривенная дневная доза для наркоманов может доходить до 2 г.

Ранее входил в состав антидота для фосфорорганических веществ из армейской индивидуальной аптечки АИ-1 (афин).



а *б*

Рис. 6-13. Структурные формулы амфетамина (*а*) и метамфетамина (*б*)

Метамфетамин (рис. 6-13, *б*) впервые синтезирован в 1919 г. С немедицинскими целями используется путем внутривенного или внутримышечного введения, перорально, а также путем вдыхания паров после смешивания с марихуаной, табаком или петрушкой. Наиболее опасной формой является «лед» — кристаллическая форма метамфетамина гидрохлорида. Часто используется в смесях с кокаином, героином или другими наркотиками. Обычная оральная или интраназальная доза амфетамина для использования с немедицинскими целями составляет 5–15 мг, доза амфетамина для внутривенного введения — 20–40 мг.

Наркотические средства и психотропные вещества, являющиеся производными амфетамина включены в Списки I, II и III Перечня.

Физико-химические свойства. Вещества основного характера. В форме оснований — маслянистые труднолетучие жидкости, в форме солей (гидрохлориды, сульфаты) — белые или слегка кремовые порошки или кристаллы, легко растворимые в полярных растворителях и практически нерастворимые в хлороформе и эфире.

Токсикокинетика и биотрансформация

После орального введения амфетамины быстро всасываются в ЖКТ и распределяются по органам, хорошо снабжаемым кровью. При внутривенном введении действие наступает через 30 с, при оральном введении — через 5–15 мин. Максимальная концентрация фенилалкиламинов в крови достигается (в среднем) в течение 2–3 ч (табл. 6-6).

Таблица 6-6. Концентрация амфетамина и метамфетамина в плазме крови

Вещество	Концентрация в плазме, мкг / мл		
	терапевтическая	токсическая	летальная
Амфетамин	0,1	0,2–3,0	До 41,0
Метамфетамин	0,01–0,05	0,1–2,0	До 43,0

Токсикокинетические характеристики амфетамина (1) *и метамфетамина* (2):

* pK~a~: 9,8 (1), 10,1 (2); * T~1/2~: 7–10 ч (1), 8–12 ч (2); * V~d~: 3–4 л / кг (1), 4–7 л / кг (2); * связывание с белками плазмы крови: 16–40% (1), 10–20% (2); * выведение в неизмененном виде: 30–74% (1), 43% (2).

Основной путь биотрансформации амфетамина и метамфетамина — окислительное деаминирование с образованием *фенилацетона* и *бензойной кислоты*, которая после конъюгации с глицином дает гиппуровую кислоту (рис. 6-14). Меньшее значение в биотрансформации имеют реакции:

* ароматического гидроксилирования с образованием активного метаболита 4-гидроксиамфетамина; * β-гидроксилирования, которое является стереоселективным для (+) -изомера амфетамина; * образование норэфедрина (фенилпропаноламина); * N-окисление.

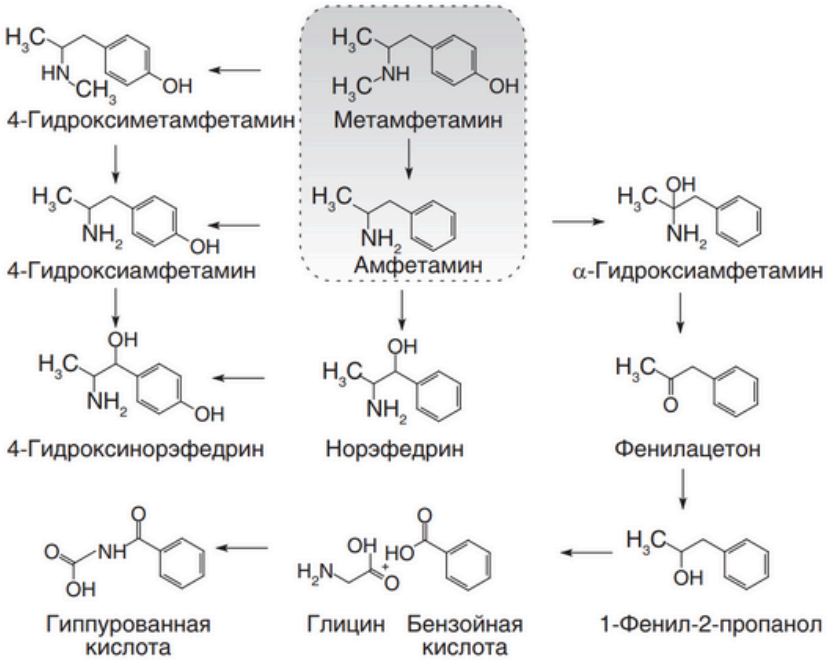


Рис. 6-14. Схема биотрансформации амфетамина и метамфетамина

Выведение. Концентрация метамфетамина в суточной моче после разового приема 10 мг составляет 0,5–4,0 мг / л, 30 мг — до 7 мг / л. В моче наркоманов концентрация метамфетамина составляет 24–333 мг / л, а концентрация амфетамина — 1–90 мг / л.

При кислом значении pH мочи максимален выход вещества в неизмененном виде с увеличением периода полувыведения, а *при щелочном значении* увеличивается процент метаболитов и снижается период полувыведения (табл. 6-7).

Таблица 6-7. Основные метаболиты амфетамина и метамфетамина

Веще-ство	Основные метаболиты, %	Примечание
Амфета-мин	Гиппуровая кислота: 16–28	30% дозы выводится в неизмененном виде с мочой за 24 ч, а 90% дозы — в течение 3–4 дней. Количество амфетаминна, выделившегося за 24 ч, может достигать 74%

	Бензоилглюкуронид: 4	дозы в кислой среде и уменьшаться до 4–1% в щелочной, при этом возрастает количество *гиппуровой и бензойных кислот (50% дозы).*
	4-Гидроксиамфетамин: 2–4	Кроме основных метаболитов выделяются конъюгированный 4-гидроксиамфетамин и фенилацетон (2%)
	Норэфедрин: 2	
Метамфетамин	Амфетамин: 5 4-Гидроксиметиламфетамин: 15	Около 70% дозы метамфетамина выводится с мочой за 24 ч. До 45% дозы выводится как неизмененное вещество, до 15% как 4-гидроксиметамфетамин и около 5% как амфетамин — основной активный метаболит. Выделение неизмененного вещества зависит от pH мочи, увеличивается при кислом значении и резко уменьшается (до 2%) при щелочных значениях. После приема больших доз амфетамин обнаруживается в моче в течение нескольких дней

Продукты ароматического гидроксилирования и N-окисления выводятся с мочой конъюгированными с серной или глюкуроновой кислотами.

Метилендиоксипроизводные фенилалкиламинов и метоксизамещенные по бензольному кольцу производные фенилалкиламинов

Химическое название, эффективные дозы и время действия синтетических фенилалкиламинов приведены в табл. 6-8.

Таблица 6-8. Химическое название, эффективные дозы и время действия синтетических фенилалкиламинов

Вещество	**Химическое название**	**Эффективная доза, мг**	**Время действия, ч**
МДА	3,4-Метилендиоксиамфетамин	200–230	8–12
МДМА	3,4-Метилендиоксиметамфетамин	80–150	4–6
МДЕА	3,4-Метилендиокси-N-этиламфетамин	100–200	3–5
ДОМ / STP	2,5-Диметокси-4-метиламфетамин	3–10	14–20
ПМА	4-Метоксиамфетамин	50–80	Короткое
ДМА	2,5-Диметоксиамфетамин	80–160	6–8
ТМА	3,4,5-Триметоксиамфетамин	100–250	6–8
ДОБ	2,5-Диметокси-4-бромамфетамин	1–3	18–30
ДОХ	2,5-Диметокси-4-хлорамфетамин	1,5–3	12–24
МБДБ	N-Метил-1-(3,4-метилендиоксифенил)-2-бутанамин	180–210	4–6
БДБ	1-(3,4-метилендиоксифенил)-2-бутанамин	150–230	4–8
ДОЭТ	2,5-Диметокси-4-этиламфетамин	2–6	14–20
Мескалин*	3,4,5-Триметоксифенэтиламин	300–500	10–12
ЛСД*	ЛСД	0,03–0,05	8–12

* Дозы и время действия приведены для сравнения.

Производные амфетамина включены в Список I Перечня.

Токсикокинетика и биотрансформация

Токсикокинетические характеристики МДА (1) и МДМА (2):

* pK~a~: 9,7 (1), 10,3 (2); * T ~½~: нет данных (1), 6–8 ч (2); * V~d~: нет данных; * связывание с белками плазмы крови: нет данных (1), 65% (2); * выведение в неизмененном виде: нет данных (1); 65% (2).

Схема биотрансформации МДМА (экстази) приведена на рис. 6-15.



Рис. 6-15. Схема биотрансформации метилендиоксиметамфетамина (экстази)

Гидроксилированные метаболиты образуют конъюгаты с глюкуроновой и серной кислотами.

В результате биотрансформации *МДА, МДМА и МДЕА* также могут образоваться 3,4-замещенные бензойные кислоты, которые, вступая в реакцию конъюгации с глицином, выводятся в виде соответствующих гиппуровых кислот.

Биотрансформация МБДБ и БДБ происходит аналогично, за исключением реакций конъюгации с глицином с образованием соответствующих гиппуровых кислот.

Выведение. МДМА выводится в неизмененном виде (около 65%) в течение 20 ч, а также как основной метаболит — 4-гидрокси-3-метоксиметамфетамин и деалкилированный метаболит — МДА (около 7%). Так, концентрация МДМА в моче после приема 105 мг составила 17 мг / л, а МДА — менее 3 мг / л.

При интерпретации результатов ХТА (на основании токсикокинетических исследований) считают, что в случае употребления:

* МДМА количество деметилированного метаболита — МДА в моче составляет не более 7–15% количества МДМА (в течение 1–4 ч); * МДЕА количество деметилированного метаболита — МДА в моче составляет не более 7–15% количества МДЕА (в течение 1–4 ч).

При *совместном употреблении нескольких соединений* этой группы наркотиков: в моче количество деметилированного метаболита — МДА составляет *более 15%* количества МДМА или МДЕА (в течение 1–4 ч).

Такие же рекомендации применимы к МБДБ и БДБ (деалкилированный метаболит МБДБ), при этом БДБ может употребляться как самостоятельное наркотическое средство.

Методы определения

Используют капельный химический анализ, ИХМ, ТСХ, ВЭЖХ, КЭ, ГХ, ГХ-МС, Фурье-ИК-спектрометрию и другие методы.

Определение фенилалкиламинов в биообъектах проводят после экстракции.

ЖЖЭ проводят в сильнощелочной среде эфиром, хлороформом или толуолом, ТФЭ — на патронах С-18, ХАД-2 и с последующей стадией — реэкстракцией (см. гл. 4). После этого возможен предварительный анализ ИХМ и/или ТСХ с дальнейшим подтверждением полученных результатов методами ГХ-МС или ВЭЖХ-МС.
При определении методом ГХ используют дериватизацию, значительно улучшающую аналитические сигналы и результаты анализа (рис. 6-16).

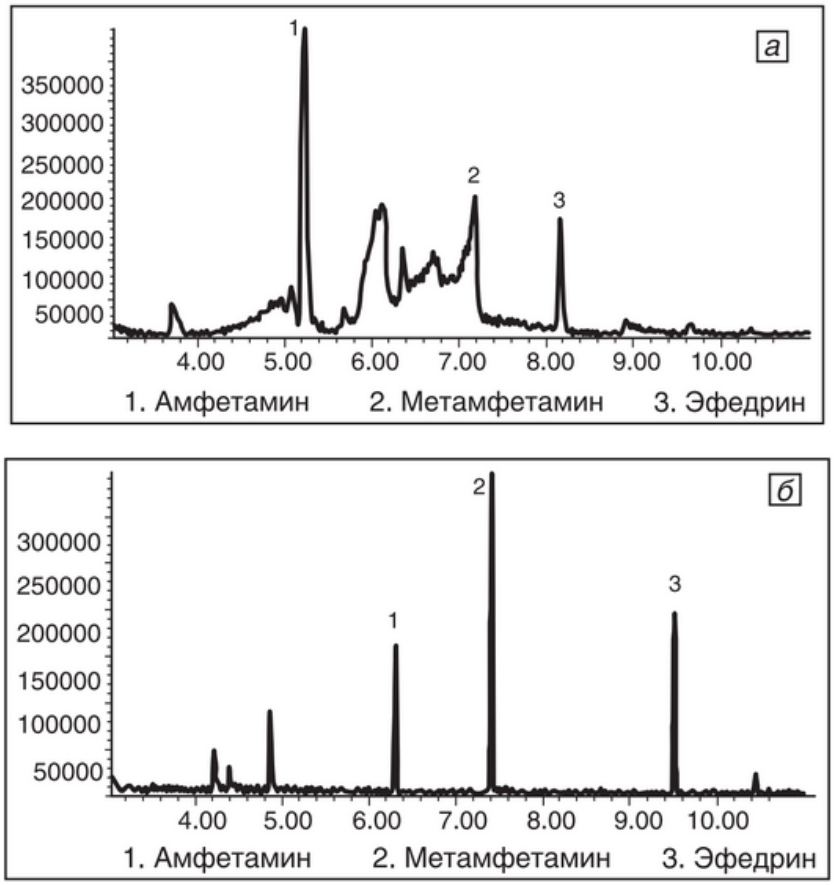


Рис. 6-16. Газовая хроматография: хроматограмма смеси фенилалкиламинов до дериватизации (*а*) и после дериватизации (*б*) пробы

Капельный химический анализ проводят при исследовании *вещественных доказательств*, используя в том числе и наборы реактивов «Наркоспектр» для внелабораторного исследования наркотиков.

6.3.4. Кокаин

Много ведь придется в будущем
увидеть тебе не алых,
а грязных и хищных парусов;
издали — нарядных и белых,
вблизи — рваных и наглых.

Александр Грин (Александр Степанович Гриневский, 1880–1932),
известный русский и советский писатель-неоромантик, поэт

Кокаин и *лист коки* — самые мощные стимуляторы растительного происхождения, известные людям. Пять наркотических средств, получаемых из куста коки, включены в Список I и II Перечня.

Основными странами — поставщиками кокаина являются Колумбия, Боливия, Венесуэла, Панама, Перу, Чили и Эквадор.

Все растение (*кокаиновый куст)* содержит алкалоиды, максимальное количество которых (до 1,5%) накапливается в листьях.

Основной алкалоид — *кокаин (метилбензоилэкгонин)*. На долю кокаина приходится 70–80% всех алкалоидов. Остальное количество составляют циннамоилкокаин, труксилин, бензоилэкгонин, метилэкгонин, гигрин, кускгигрин и др. Содержание кокаина (рис. 6-17) в листьях растения *Erythroxylum coca* составляет от 0,4 до 2,5%.

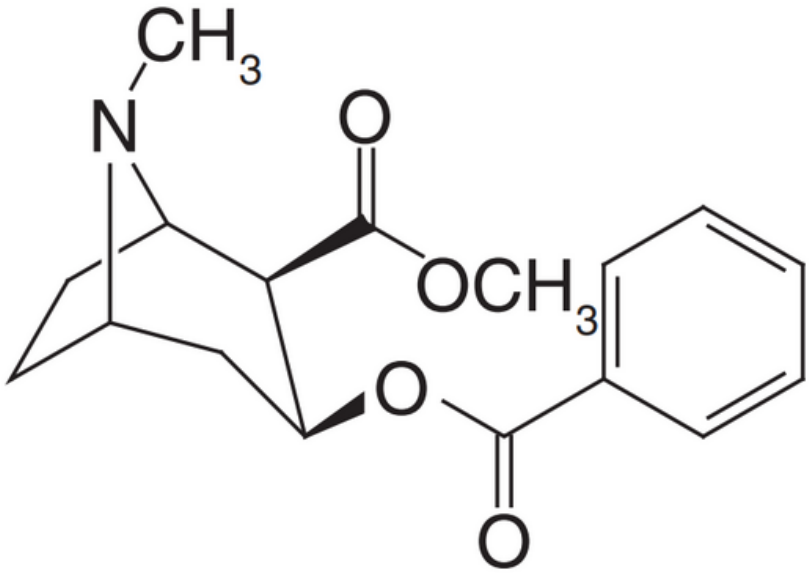


Рис. 6-17. Структурная формула кокаина

Листья коки**.** Потребление листьев коки первоначально было прерогативой элиты древних индейцев. Сегодня их потребляют большинство аборигенов Южной Америки.

Паста кокаина — сульфат кокаина (basuco, basa, pitillo, «тесто»). Это низкосортный наркотик, который применяется в городских трущобах Южной Америки. Паста — промежуточный продукт переработки.

Кокаина гидрохлорид — белый кристаллический порошок (chow) или большие иногда бесцветные кристаллы (rock), *t*~пл ~— 157–202 °С, обычно без запаха, хорошо растворим в воде, малорастворим в этаноле. Так, 1 г кокаина гидрохлорида растворяется в 0,5 мл воды, но в 3,5–4,5 г этанола. Этими свойствами часто пользуются контрабандисты для нелегальной перевозки наркотика в виде растворов, маскируя кокаин под ликероводочные или парфюмерно-косметические изделия. (Литровая бутыль может содержать раствор, в котором содержится до 70% кокаина гидрохлорида.) Для уличной торговли кокаина гидрохлорид разбавляется до 12–50% добавлением пирацетама, кофеина, лидокаина, прокаина, бензокаина, сахарами и крахмалом.

Используется кокаина гидрохлорид для внутривенного введения или получения кокаина основания.

Кокаина основание (крэк, freebase, crack) — белый кристаллический порошок, *t*~пл ~— 98 °С, получают из кокаина сульфата обработкой щелочными растворами (например, раствором гидрокарбоната натрия). Основание кокаина нерастворимо в воде, обычно употребляется в виде паров после возгонки порошка с фрагмента фольги при нагревании или его смешивают с табаком (гашишем). Действие крэка в 5–10 раз сильнее *при курении*, чем действие соли кокаина. Крэк курят отдельно или вместе с табаком либо вдыхают через специальные трубочки. Кокаина основание быстро проникает в мозг, обеспечивая выраженную эйфорию. Трубочки для использования крэка и кокаина состоят из двух отделений. В одно отделение помещают препарат, а в другое — охлаждающую жидкость. Стеклянные трубочки часто трескаются в процессе нагревания, отсюда и название препарата. По другой версии название «крэк» связано с потрескиваниями при горении наркотика.

Для *маскировки наркотика* под растворимый кофе или чай соли кокаина смешивают с хлоридами кобальта или железа до получения состава, содержащего примерно 40% кокаина, и транспортируют под названием «коричневый кокаин». После доставки наркотика на место его потребления кокаин выделяют экстракцией органическими растворителями. Черный кокаин получают смешиванием солей кокаина с полимерным материалом, из которого затем изготовляют статуэтки, портфели-дипломаты, подставки и прочие предметы. В последующем кокаин выделяют экстракцией органическими растворителями.

Наркоманы со стажем часто соединяют кокаин с героином. Смесь кокаина и героина в равных пропорциях называют Speed-ball mixture. При этом действующая доза кокаина снижается до 10–4 мг. При курении или внутривенном введении наркотическое действие каждого компонента смеси усиливается. Крэк в составе спидбола является стимулятором с коротким, от 8 до 10 мин, и чрезвычайно интенсивным эффектом. Настроение

потребителя спидбола меняется быстро и непредсказуемо. «Спидбол» в ответе за многие смерти (например, за смерть известного актера-комика Джона Белуши).

Фармакология и токсикология

Первым, кто исследовал действие кокаина на организм, был Зигмунд Фрейд.

Кокаин оказывает влияние на дофаминергическую систему. До сих пор 1–5% раствор кокаина применяют в качестве местноанестезирующего препарата в хирургии глаза, носа, уха и глотки. Кокаин вызывает сужение кровеносных сосудов, уменьшает кровотечение (периферические эффекты), а также расширяет зрачок. Высшая разовая доза 0,03 г, высшая суточная доза 0,03 г.

При всасывании кокаин воздействует на ЦНС, вызывая эмоциональный подъем, ощущение прилива энергии, повышение умственной активности, долгий период бодрствования, снижение потребности во сне, подавляя аппетит, увеличивая физическую выносливость.

Основные признаки потребления кокаина:

* расширенные зрачки; * хронический насморк и частые респираторные заболевания; * покраснение кожи от постоянного почесывания («укусы кокаиновых клопов»); * расстройство сна, бессонница; * неопрятный внешний вид; * потеря массы тела; * неразборчивая речь; * раздражительность, агрессивность, злоба.

Способы введения. При *интраназальном* введении кокаин попадает в мозг через 3–5 мин, достигает пика активности через 15–20 мин, эффект длится 1–1,5 ч. Доза («дорожка» длиной 3–5 см) составляет от 10–20 до 50–100 мг.

При *внутривенном* способе введения кокаина эффект наступает через 15–30 с, достигает пика активности через 3–5 мин и длится очень недолго.

При *курении* вещества (чаще всего крэка) кокаин попадает в мозг практически сразу (через 6–7 с), эффект длится 10–15 мин.

Пероральный способ введения наиболее токсичен из-за гидролиза препарата в ЖКТ. Токсическая оральная доза — 500 мг.

При индивидуальных вариациях *летальная доза* колеблется от 20 мг до 8–10 г, составляя в среднем *1,2 г для наркомана*, а для человека, ранее *не употреблявшего* наркотик, — 200 мг.

При передозировке возникают:

* психомоторное возбуждение; * бред; * гипертермия; * судороги.

Возбуждающее, веселящее действие кокаина (сумеречное состояние) сближает кокаинизм с алкоголизмом. Смерть может наступить от нарушения дыхания и паралича сердца, концентрация кокаина в крови при этом обычно *превышает 6,2 мг / л*. При длительном употреблении кокаин вызывает тяжелые побочные эффекты.

Кокаин часто принимают вместе с бензодиазепинами, метаквалоном, опиатами и метадоном, реже комбинируют с барбитуратами, алкоголем, пропоксифеном (синтетический морфиноподобный аналгетик) и хинином.

При кокаинизме развивается *толерантность*. В течение нескольких месяцев наркоманы потребляют до 5–10 г кокаина, в то время как у людей, не принимающих кокаин, 100 мг препарата является максимальной допустимой дозой при местной анестезии.

Токсикокинетика и биотрансформация

Биодоступность кокаина при различных способах введения:

* оральный: 20–40%; * интраназальный: 20–40%; * курение: 6–32%; * внутривенный: 100%.

Токсикокинетические характеристики:

* pK~a~: 8,6; * T~1 / 2~: 0,7–1,5 ч; * V~d~: 1,6–2,7 л / кг; * связывание с белками плазмы крови: 92%; * выведение в неизмененном виде: 1–9% (в зависимости от pH мочи).

Кокаин быстро метаболизируется:

* до метилэкгонина при ферментативном гидролизе под действием холинэстеразы плазмы крови; * до бензоилэкгонина в результате неэнзимного гидролиза; * до норкокаина в результате N-деметилирования.

Метаболитами кокаина являются бензоилэкгонин, экгонин и метиловый эфир экгонина (*неактивные метаболиты*), норкокаин (*активный метаболит*) и ряд других — этилэкгонин, гидроксикокаин, метилэкгонидин (рис. 6-18).

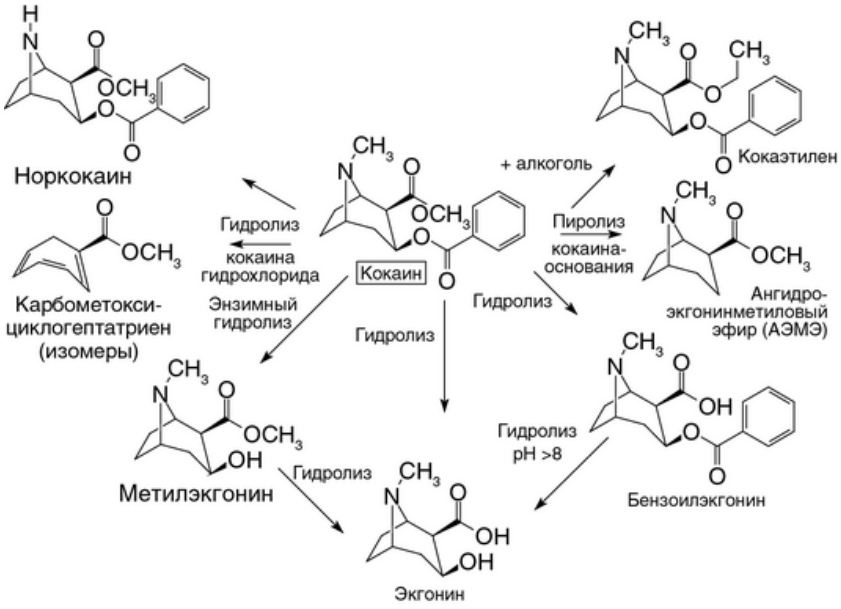


Рис. 6-18. Схема биотрансформации кокаина: при курении (пиролизе) кокаина основания образуется метиловый эфир ангидроэкгонина (АЭМЭ), кокаина гидрохлорида — карбометоксициклогептатриен; обнаружение в моче АЭМЭ указывает на курение кокаина основания (крэка)

T~1/2~ бензоилэкгонина 4–6 ч, метилэкгонина 2–7 ч.

Выведение. Разовая доза кокаина выводится с мочой на 90–95% за 2–3 дня в виде кокаина (1–9%), бензоилэкгонина (35–54%), метилэкгонина (32–49%), экгонина (1–8%), норкокаина и гидроксилированных метаболитов (до 10%).

Кокаин может обнаруживаться в моче в неизмененном виде от 8 до 24 ч, а бензоилэкгонин и метилэкгонин — до 48 ч. При хроническом потреблении время возможного обнаружения увеличивается до 5 дней.

При *одновременном употреблении алкоголя и кокаина* образуется активный метаболит — *кокаэтилен* (этилбензоилэкгонин), а также норкокаэтилен, этиловый эфир экгонина. Кокаэтилен по своим свойствам похож на кокаин и обнаруживается в моче вместе с метаболитом кокаина бензоилэкгонином, что является *маркером* одновременного злоупотребления кокаина и алкоголя.

После внутривенного введения кокаина 1–9% препарата выделяется с мочой в неизмененном виде, 35–55% — как бензоилэкгонин. Выведение кокаина в неизмененном виде увеличивается, если моча имеет кислую среду; при этом выводится незначительное количество экгонина.

После интраназального приема кокаина до 4% дозы выделяется с мочой в неизмененном виде в течение 24 ч и 16–36% дозы — в виде бензоилэкгонина.

Около 30–60% вещества, веденного орально, интраназально или внутривенно, выделяется с мочой в виде метилового эфира экгонина.

С фекалиями кокаин в неизмененном виде не выводится.

В плазме крови:

* терапевтическая концентрация кокаина 0,12–0,47 мкг / мл сохраняется в течение 1 ч после интраназального приема 1,5 мг / кг кокаина; * токсическая концентрация кокаина составляет 0,25–5 мкг / мл; * летальная концентрация кокаина обычно превышает 1 мкг / мл (табл. 6-9).

Таблица 6-9. Результаты анализа аутопсийного материала после внутривенной передозировки кокаина: содержание кокаина и его основного метаболита в биожидкостях, мкг/мл и печени, мкг/г

Биообъект	**Кокаин**	**Бензоилэкгонин**
Кровь	1,2–7,6 (2,7)	1,0–7,4 (4,4)
Печень	0,04–3,2 (1,2)	1,4–7,1 (4,2)
Моча	38,4–118,6 (76)	15–185 (110)

Примечание. В скобках приведены средние значения.

При исследовании биообъектов на присутствие кокаина следует иметь в виду:

* соотношение содержания основных метаболитов в различных биообъектах; * особенности распределения кокаина и его метаболитов.

Различный качественный и количественный состав метаболитов кокаина в моче, поте и волосах свидетельствует о различных механизмах выделения наркотиков в биологические жидкости и волосы (табл. 6-10).

Таблица 6-10. Соотношение содержания основных метаболитов кокаина в различных биообъектах

Моча*	**Пот**	**Волосы**
Бензоилэкгонин = метиловый эфир экгонина > кокаин	Кокаин > метиловый эфир экгонина > бензоилэкгонин	Кокаин > бензоилэкгонин > метиловый эфир экгонина

* Биотрансформация кокаина продолжается в отобранной пробе мочи, поэтому в нее добавляют консервант — натрия фторид.

Распределение кокаина и его метаболитов:

* кокаин и норкокаин (липофильные соединения) легко преодолевают гематоэнцефалический и плацентарный барьеры; содержание кокаина в мозге относительно высокое и стабильное; * метаболиты кокаина — бензоилэкгонин и экгонин (полярные соединения) не способны преодолевать гематоэнцефалический барьер в токсикологически значимых концентрациях; * кокаин в высоких концентрациях накапливается в жировых депо; * подкожная жировая клетчатка и ороговевшие частички кожи людей, длительно употреблявших кокаин, содержат небольшие количества наркотика.

Методы определения

Исследование биологических объектов. Из биожидкостей кокаин изолируют ТФЭ (см. гл. 4) или ЖЖЭ (при pH 9–10 различными органическими растворителями, например смесью хлороформ–изопропанол 3:1).

Используют (см. гл. 5):

* хромогенные реакции с различными реактивами; * метод ТСХ (позволяет иденифицировать кокаин в присутствии родственных соединений); * ИХМ; * методы ВЭЖХ, ГХ с различными детекторами, ГХ-МС; * Фурье-ИК-спектрометрию и др.

МС кокаина и основные фрагментарные ионы кокаина, определяемые методом МС, представлены на рис. 6-19, 6-20.

Исследование волос и ногтей. Для решения ряда экспертных задач возникает необходимость анализа таких биообъектов, как волосы и ногти (см. гл. 4). Содержание кокаина в волосах *не зависит от способа введения*.

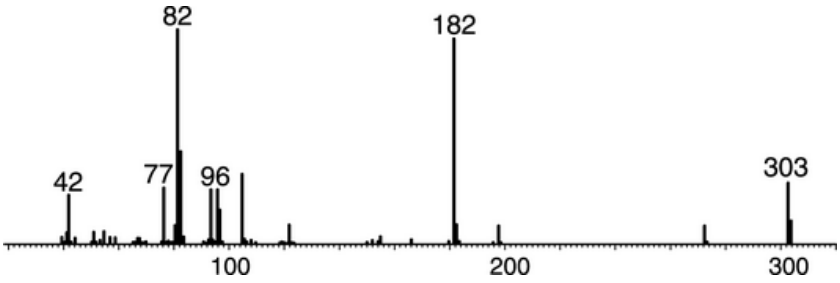


Рис. 6-19. Масс-спектр кокаина

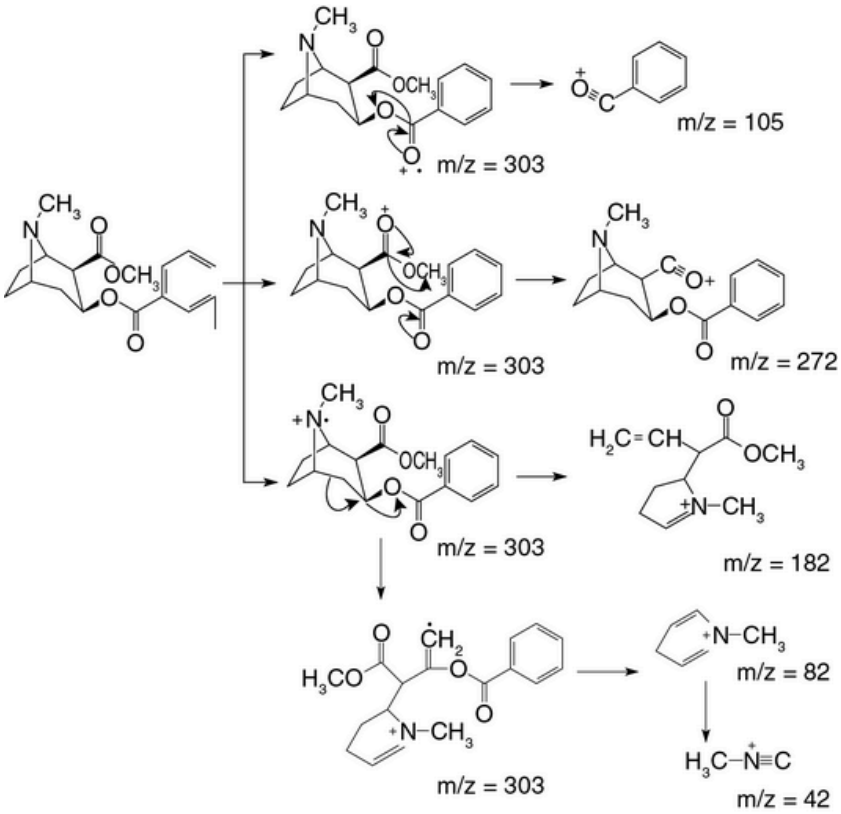


Рис. 6-20. Фрагментация кокаина при масс-спектрометрии

Возможность определить кокаин в волосах после приема разовой дозы сохраняется от 2 до 6 мес. *Максимальное* содержание кокаина в волосах определяется в течение 1–2 мес после приема разовой дозы (рис. 6-21).

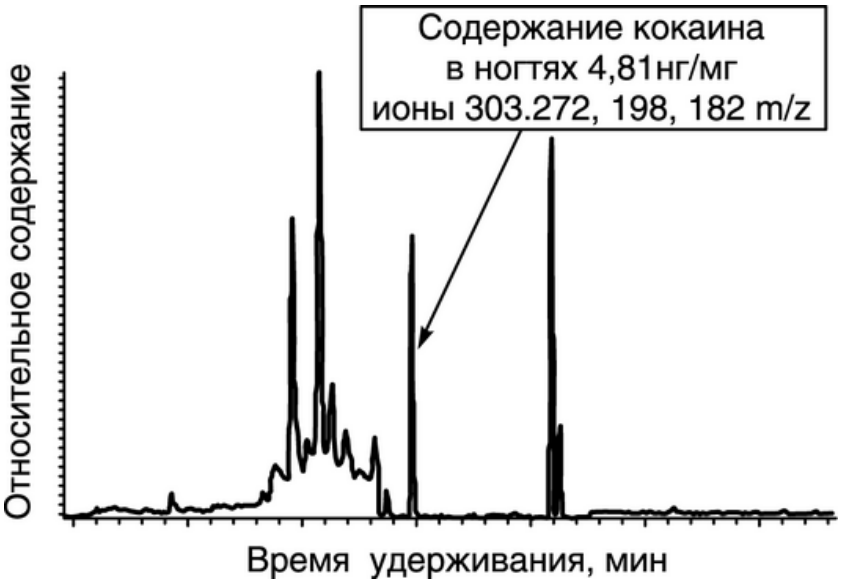


Рис. 6-21. Определение кокаина в ногтях методом ГХ-МС

Содержание кокаина, определяемое в волосах, лежит в пределах 0,1–16 нг / мг (если полученное содержание выше 20 нг / мг, то результаты следует рассматривать как ошибочные). Содержание бензоилэкгонина в волосах менее 1 нг / мг. Содержание метилэкгонина — на уровне предела обнаружения метода или ниже.

6.3.5. Галлюциногены

Я отстраняю мягко видимый мир.
Слышу вдали и вблизи неясный рев.
Странный далекий голос в моих ушах.
Может быть, мой? Ну, что же, мои слова падают странно сквозь день, словно во сне. Тусклый солнечный свет мне снится. Зато ясным взглядом любви я вижу людей, быстро идущих куда-то своим путем. Мир очень красив. Минуты и дни связаны танцем чистого забытья. Я примирен и с Богом, и с людьми. Сыпься же, тихий песок в стеклянных часах. Я безмятежен и не слежу за тем, как равнодушно ты УБИВАЕШЬ меня.

«Пьющий абсент» — автор
Артур Саймонс (1865–1945),
английский поэт-символист

Галлюциногены — это вещества, в клинической картине отравления которыми преобладает нарушение психики, проявляющееся в искажении восприятия реального мира (цвета, запаха, вкуса, а также пространства и времени).

Большинство галлюциногенов — вещества животного и растительного происхождения, используемые человеком с древних времен с ритуальными целями. К числу галлюциногенов относятся некоторые производные триптамина (см. ниже) и фенилэтиламина, нарушающие проведение нервного импульса преимущественно в серотонинергических и катехоламинергических синапсах мозга. Характерной особенностью интоксикации ими является отсутствие амнезии на пережитые события.

Наиболее изученный и известный из всех галлюциногенов — ЛСД.

ЛСД (N, N-диэтиламид-D-лизергиновой кислоты) был впервые получен в 1938 г. в швейцарской лаборатории «Сандоз» доктором А. Хофманом (Hoffman), который в то время проводил эксперименты с производными алкалоидов спорыньи. Психоделические свойства ЛСД стали известны человечеству 16 апреля 1943 г. Именно в этот день Хофман, работавший в лаборатории Штоля в Базеле, случайно нарушив элементарные правила техники безопасности работы в химической лаборатории, принял ничтожное количество вещества внутрь. В результате развилась интоксикация, сопровождавшаяся серьезным нарушением психики. С этого момента началось экспериментальное изучение галлюциногенов.

ЛСД (рис. 6-22) является одним из многочисленных полусинтетических производных алкалоидов спорыньи (*Secale cornutum, Claviceps*) — гриба, паразитирующего на колосьях ржи.

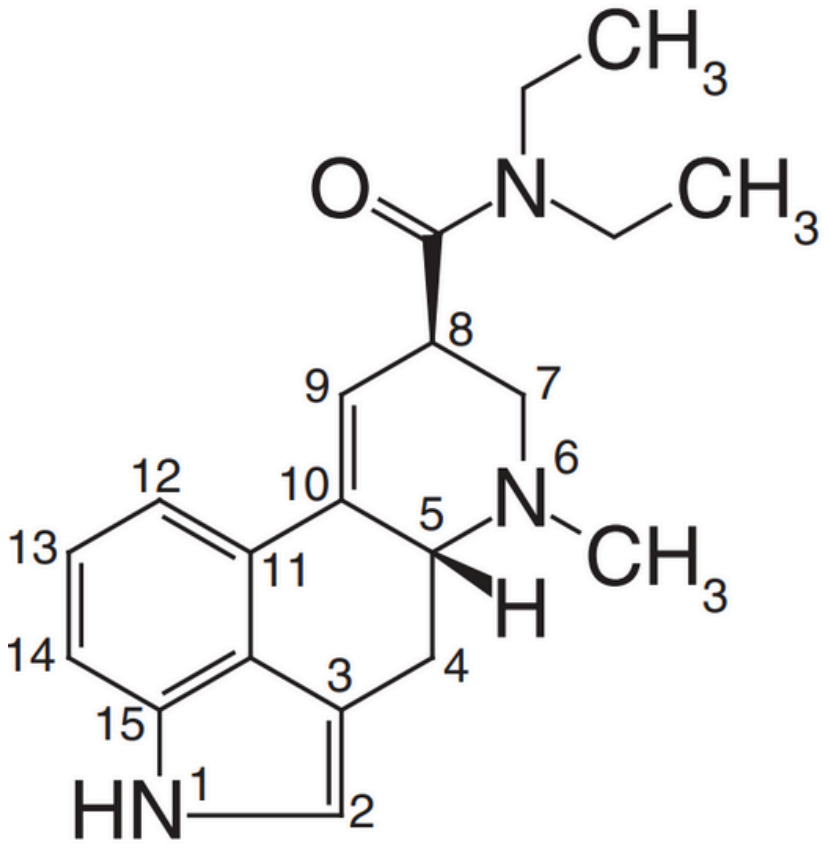


Рис. 6-22. Структурная формула диэтиламида лизергиновой кислоты

Молекула ЛСД имеет два хиральных центра (C*5 и C*8), причем заместитель при C*8 (N, N-диметиламидная группа) расположен экваториально. Из четырех возможных стереоизомеров только D-ЛСД проявляет психоактивное действие. Изомер, содержащий тот же заместитель при C*8 в аксиальном положении, неактивен и известен как изо-ЛСД.

D-изомер ЛСД является одним из самых активных психотропных веществ, известных человеку до настоящего времени как среди синтетических, так и среди природных веществ. С получением ЛСД началась эра выделения психотомиметиков из природных соединений. Изменяя их структуру, было получено большое количество различных полусинтетических и синтетических препаратов, обладающих галлюциногенной активностью.

На территории РФ ЛСД, как и другие производные лизергиновой кислоты, запрещены и включены в Списки I и IV Перечня.

Чаще всего ЛСД получают в виде порошка или раствора. В незаконный оборот он обычно поступает в виде таблеток, капсул по 100 мкг, растворов для инъекций, тонких квадратов желатина (window panes), «марок» — перфорированной бумаги (blotter acid), пропитанной раствором ЛСД.

Фармакология и токсикология

Водорастворимый препарат ЛСД — тартрат диэтиламина D-лизергиновой кислоты — под названием «ЛСД-25», «Delyside» и «Lysergide» иногда применяется в клинической и фармакологической практике *за рубежом* при психоанализе для облегчения выявления и устранения пережитых в детстве психических травм.

Доза ЛСД сильно варьирует, но чаще всего составляет от 30 до 50 мкг. Большинство исследователей считает 10–30 мкг ЛСД *минимальной действующей* дозой для человека. Дозы ЛСД, применяемые для создания *«искусственного» психоза,* лежат в пределах 70–150 мкг или 1–2 мкг / кг массы тела.

Изменения психики могут сохраняться до нескольких дней, у активно потреблявших ЛСД до нескольких месяцев и более. ЛСД оказался приблизительно в 4000 раз активнее мескалина и в 100 раз активнее открытого позднее псилоцибина.

При *внутривенном* введении эффект проявляется через 1–5 мин, при *внутримышечном* — через 15–20 мин, при приеме *внутрь* — через 30–60 мин. *Ингаляционный путь* воздействия требует в 3–4 раза бóльших доз ЛСД, чем при приеме внутрь или при внутривенном введении. Действие наступает через 15 мин после вдыхания аэрозоля ЛСД и достигает пика через 1,5 ч. Большинство симптомов исчезает через 5,5 ч, а полностью выздоровление наступает через 8–12 ч.

ЛСД хорошо всасывается при *пероральном* приеме, поэтому чаще всего используют этот способ введения. При приеме препарата внутрь через 20 мин появляются вегетативные симптомы, через 30–60 мин — психические нарушения (галлюцинаторный психоз), которые достигают максимальной выраженности через 1,5–2 ч. Продолжительность психоза составляет 4–15 ч, при приеме больших доз действие пролонгируется.

Эффект ЛСД при одном и том же способе введения зависит от дозы. В минимальных дозах (50–70 мкг) он вызывает состояние, напоминающее алкогольное опьянение. При увеличении дозы до 75–100 мкг появляется эйфория или апатия. ЛСД в *больших дозах* (200 мкг и более) вызывает характерное психотомиметическое состояние с бредовыми идеями и потерей критического отношения к своим переживаниям. Полная потеря контакта с реальностью вплоть до появления чувства «растворения» личности отмечена при введении *ЛСД в дозах 600 мкг* и выше.

Соматические расстройства, которые встречаются наиболее часто: расширение зрачков, тахикардия, слюнотечение, реже — тошнота, головокружение, потливость, покраснение лица.

Механизм действия. ЛСД воздействует на разнообразные рецепторы *G*-белков, связывается практически со всеми серотониновыми рецепторами, исключая 5-НТ3 и 5-НТ4, но не вызывает активации большинства из них из-за недостаточной концентрации в синапсе. Для 5-НТ2-рецепторов ЛСД является агонистом. Психоактивное действие ЛСД в дозе 50–70 мкг объясняют именно агонистическим эффектом на 5-НТ2А-рецепторы, так как известно, что агонисты этих рецепторов являются психоактивными, а антагонисты полностью блокируют психоактивное действие ЛСД. Рекреационные дозы могут влиять на рецепторы 5-НТ1А, 5-НТ2А, 5-НТ2С, 5-НТ5А, 5-НТ5В и 5-НТ6. Предполагают, что ЛСД вызывает усиленное выделение глутаминовой кислоты в мозговом стволе и далее может действовать через механизм *DARPP*-32-путей. *DARPP*-32 в больших количествах синтезируется в нейронах прилежащего ядра — отдела мозга, составляющего часть «системы награды» (см. п. 6.2). *DARPP*-32 регулируется двумя нейротрансмиттерами (дофамином и глутаматом). Дофамин активирует *DARPP*-32 через *D*1-рецептор и блокирует через *D*2-рецептор. Глутамат через N-метил-D-аспартат-рецептор подавляет активность *DARPP*-32. Даже небольшие изменения уровня фосфорилирования *DARPP*-32 вызывают каскад серьезных изменений в головном мозге. Однако полностью механизм действия ЛСД не изучен.

Ежедневный прием ЛСД вызывает быстрое привыкание к препарату. При длительном применении ЛСД развивается *психическая зависимость*, при этом наблюдается деградация личности, возможны развитие слабоумия, резкое нарушение памяти, суицидальные мысли и поступки.

Лица, злоупотребляющие ЛСД, оканчивают свои дни в психиатрических клиниках или умирают от болезней, вызванных токсическим действием препарата.

ЛСД способен вызывать возвратные галлюцинации («возвратные вспышки», flashbacks) даже спустя 6 мес с момента последнего употребления.

Токсикокинетика и биотрансформация

Вещество способно быстро проникать в организм через ЖКТ, а также через слизистые оболочки дыхательных путей (при ингаляции в форме аэрозоля). Максимальная концентрация в крови и тканях отмечается через 10–20 мин после приема. ЛСД быстро всасывается и, легко преодолевая гематоэнцефалический барьер, достигает мозга. Уровни ЛСД в плазме крови и моче в течение нескольких часов после приема разовой дозы составляют *менее нанограмма*. Максимальная концентрация в плазме после орального приема ЛСД в дозе 1 мкг / кг достигается через 1 ч и в интервале до 3 ч составляет 1,7–1,85 нг / мл. Затем концентрация препарата резко снижается до 1,1 нг / мл через 6 ч и до 0,2 нг / мл через 24 ч.

Токсикокинетические характеристики:

* pK~a~: 7,5; * T ~½~: 2,9–5,1 ч; * V~d~: 0,3 л / кг; * связывание с белками плазмы крови: 90%; * выведение в неизмененном виде: менее 1%.

Биотрансформация. Основные сведения о биотрансформации ЛСД получены экспериментально *in vivo* (на животных) или *in vitro* (с микросомами печени человека), так как данных о биотрансформации ЛСД в организме человека недостаточно.

N-деметил-ЛСД (нор-ЛСД) и его эпимер; 2-оксо-ЛСД; 2-оксо-3-гидрокси-ЛСД; 12-, 13- и 14-гидрокси-ЛСД являются *основными метаболитами* ЛСД; этиламид лизергиновой кислоты (ЛАЭ), его эпимер — изо-ЛАЭ и другие метаболиты образуются в незначительных количествах. Все метаболиты выделяются в виде конъюгатов с глюкуроновой кислотой (рис. 6-23).

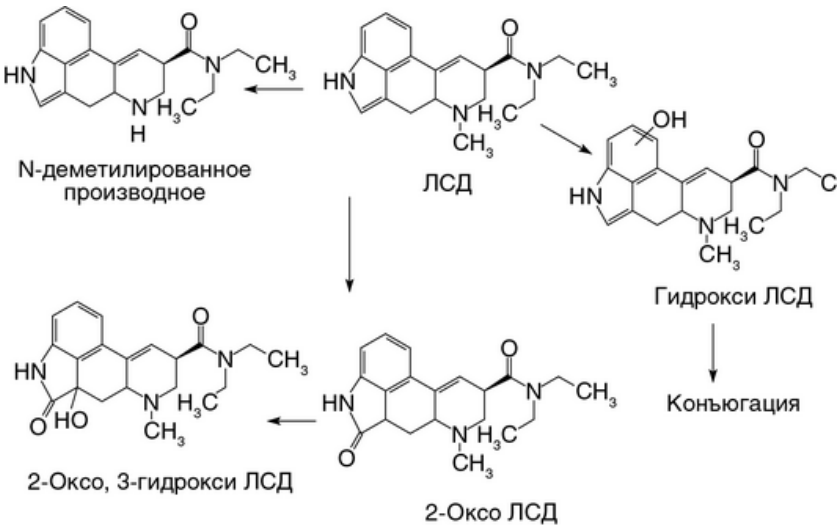


Рис. 6-23. Схема биотрансформации ЛСД

Выведение. ЛСД и его метаболиты практически не накапливаются в органах и тканях из-за малого *V~d~*. Содержание ЛСД в волосах составляет пикограммовые количества.

ЛСД быстро метаболизируется и выводится из организма с мочой. Менее 1% дозы обнаруживается в моче в неизмененном виде.

Концентрация неизмененного наркотика в моче после принятия дозы 200–400 мкг в течение 1-х суток составляет 0,001–0,005 мкг / мл.

Методы определения

Определение ЛСД, особенно *в биологических жидкостях*, представляет серьезную аналитическую проблему из-за низких концентраций ЛСД и его метаболитов в биопробах, а также из-за того, что процентное содержание наркотика быстро уменьшается под воздействием тепла, света и кислорода воздуха и нестабильности в растворах при pH ниже 4,0. Если при хранении и пробоподготовке образцов предпринять соответствующие меры предосторожности, то такие особенности аналита не повлияют на результаты анализа.

Анализ ЛСД в биожидкостях

* Органические растворители низкой полярности, например 1-хлорбутан или смесь толуола с метиленхлоридом (7:3), эффективно извлекают ЛСД из биожидкостей при pH выше 9. * При использовании высокоселективных методов типа ГХ-МС с отрицательной химической ионизацией или ГХ-МС-МС дополнительной пробоподготовки не требуется. * При использовании ГХ-МС с ионизацией электронным ударом полученные экстракты должны быть дополнительно очищены различными путями, например реэкстракцией в кислоту или ТФЭ. * Наиболее часто при исследовании биожидкостей на присутствие ЛСД используют получение триметилсилильных производных с помощью нагревания сухих остатков после экстракции с BSTFA при 70 °C в течение 15–30 мин. * Специально

для исследования методом ГХ-МС с отрицательной химической ионизацией ЛСД в моче или плазме крови используют получение ТФА-производных.

Определение ЛСД и его метаболитов *в биологических жидкостях и волосах* проводят высокочувствительными и селективными методами (см. гл. 5): ГХ-МС, ВЭЖХ-МС, КЭ с флуоресцентной или МС-детекцией (рис. 6-24).

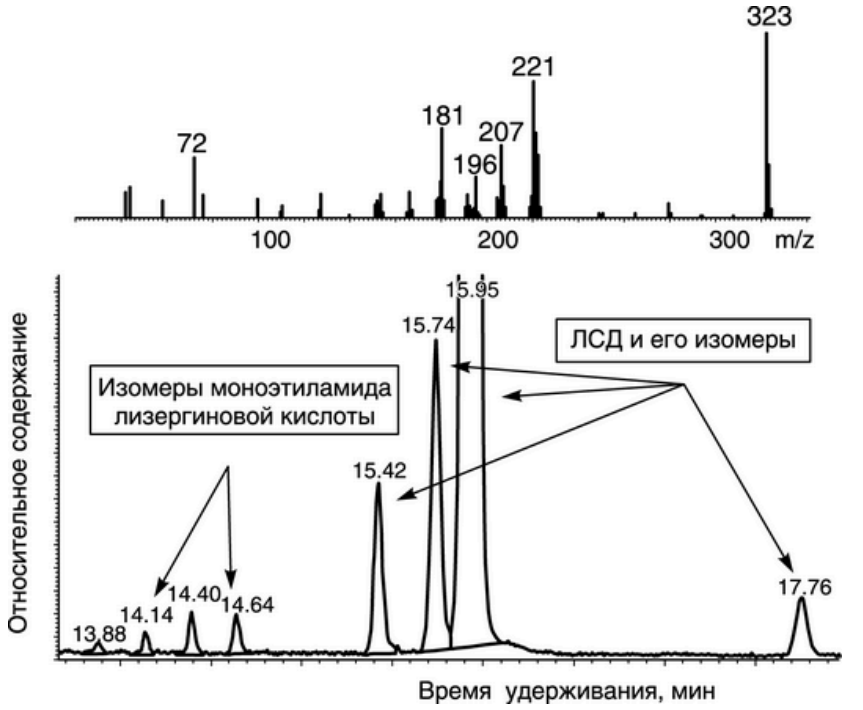


Рис. 6-24. Определение ЛСД методом ГХ-МС в экстракте мочи

В последнее время при изучении метаболизма ЛСД в микросомах печени методами ВЭЖХ-МС-МС и КЭ-МС-МС удалось обнаружить два новых метаболита ЛСД.

Триптамин и его структурные аналоги

Так я и знал наперед, что они красивы,
эти грибы, убивающие людей.

Кобаяси Исса (1763–1828),
японский поэт, мастер хайку
(лирические стихи о единстве
природы и человека)

Диметилтриптамин (ДМТ), его производные и аналоги широко распространены в животном и растительном мире, но могут быть получены и синтетическим путем.

ДМТ — психоделик относительно краткосрочного действия, потребление которого засвидетельствовано во многих культурах древнего и современного мира.

Большое число веществ, обладающих галлюциногенной активностью, имеют сходную с ДМТ структуру и свойства. Диэтилтриптамин (ДЭТ), например, аналогичен ДМТ и вызывает те же фармакологические эффекты, но обладает более низкой активностью (рис. 6-25).

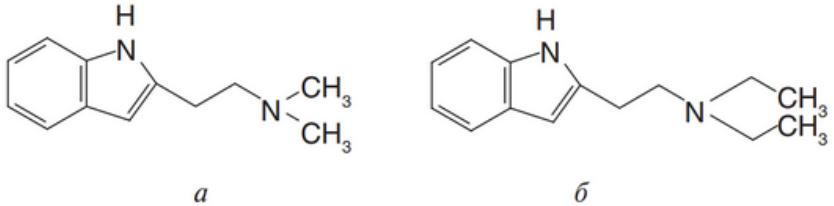


Рис. 6-25. Структурные формулы диметилтриптамина (*а*) и диэтилтриптамина (*б*)

Псилоцин и псилоцибин имеют в своей основе структуру ДМТ (рис. 6-26). Семейства грибов, содержащих галлюциногенные вещества, весьма многочисленны. Этот список возглавляют представители семейства *Strophariaceae* (строфариевые) — *Psilocybe*, *Stropharia*.

С давних пор (еще до открытия Америки) индейцы в Мексике и Гватемале использовали во время религиозных церемоний для достижения особого состояния опьянения «священные» грибы, которые называли teonanacatl, God's Flash — «божественный огонь». Оказалось, что высушенные грибы содержат от 0,2 до 0,4% псилоцибина (4-фосфорилокси-N, N,-диметилтриптамина) и следовые количества псилоцина (4-гидрокси-N, N,-диметилтриптамина). Оба алкалоида в кристаллической форме были выделены в 1958 г. в лаборатории Sandoz из грибов рода *Psilocybe*, выращенных в условиях теплицы.

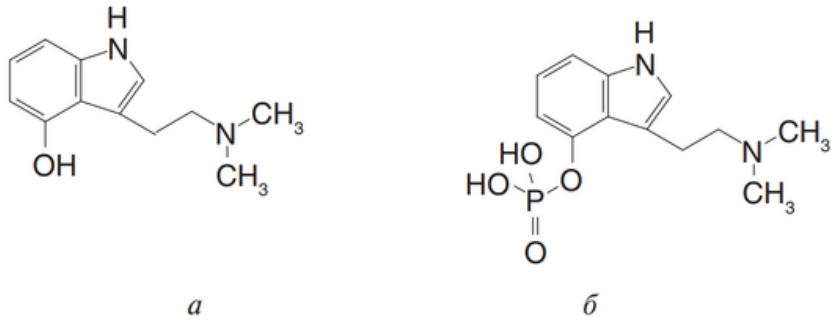


Рис. 6-26. Структурные формулы: псилоцина (4-гидрокси-диметилтриптамин) (*а*) и псилоцибина (сложный эфир 4-гидрокси-ДМТ и фосфорной кислоты) (*б*)

Основа молекул псилоцина и псилоцибина — структура ДМТ. В настоящее время из рассматриваемой группы на территории России распространены псилоцин и псилоцибин в основном как действующие вещества галлюциногенных грибов, а также ДМТ как составляющая аяхуаски (айахуаски) и других подобных напитков. Эти вещества внесены в Перечень. За рубежом кроме них распространены буфотенин, 5-метоксидиметиламинотриптамин (5-Мео-ДМТ) и другие замещенные триптамины.

В табл. 6-11 приведены химические формулы галлюциногенных триптаминов. В табл. 6-12 приведены дозы, пути введения и продолжительность их действия.

Таблица 6-11. Химическая структура некоторых галлюциногенных триптаминов

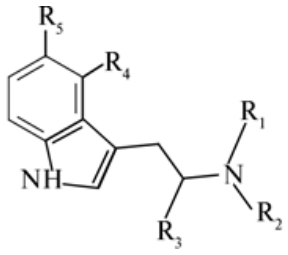
№ п/п	Вещество						Примечания
		-R~1~	**-R~2~**	**-R~3~**	**-R~4~**	**-R~5~**	
1	5-Мео-ДМТ	-CH~3~	-CH~3~	-H	-H		Аналог наркотического средства
2	Буфотенин	-CH~3~	-CH~3~	-H	-H		
3	ДМТ	-CH~3~	-CH~3~	-H	-H	-H	
4	ДЭТ	-C~2~H~5~	-C~2~H~5~	-H	-H	-H	Оборот на территории Российской Федерации запрещен
5	Псилоцибин	-CH~3~	-CH~3~	-H	-H~2~PO~4~	-H	
6	Псилоцин	-CH~3~	-CH~3~	-H	-OH	-H	
7	Этриптамин	-H	-H	-C~2~H~5~	-H	-H	

Таблица 6-12. Дозы, пути введения и продолжительность действия некоторых галлюциногенных триптаминов

№ п/п	Вещество	Действующая доза, путь введения и продолжительность действия		
		доза, г	путь введения	продолжительность действия, ч
1	Буфотенин	0,008–0,016	Внутривенно	1–2
2	5-МеО-ДМТ	0,006–0,020	Курение	1–2
		0,002–0,003	Внутривенно	
		более 0,300	Орально	Начало действия через 40–45 мин, максимум действия 1,5–2 ч
3	ДМТ	0,060–0,100	Внутримышечно	1,5–2
		0,060–0,100	Курение	Через несколько минут практически максимальное воздействие
		0,004–0,030	Внутривенно	
4	ДЭТ	0,050–0,100	Орально	2–4
5	Псилоцин/ псилоцибин	0,010–0,020	Орально	3–6
6	Этриптамин	0,100–0,250	Орально	6–8
7	Айяхуаска или ее аналог	аналогично оральным дозам триптаминов	Орально	6–8

Широкое распространение получили еще два наркотика, оказавшихся активными при приеме внутрь. Это α-метилтриптамин (АМТ) и 5-метокси-диизопропилтриптамин (5-МеО-ДИПТ). Последний из них получил название Foxy Methoxy или Foxy (Лисичка).

Действие псилоцибина и псилоцина напоминает действие ЛСД, характеризуется нарушением восприятия, расстройством мышления, изменениями в эмоциональной сфере и поведении человека, способностью стимулировать аффективную (чувственную) память. Через 30 мин после приема развивается выраженная картина интоксикации со зрительными галлюцинациями, которая сохраняется в течение 6 ч и заканчивается сном.

Простейшим способом приема галлюциногенов данного вида является употребление в пищу свежих или высушенных грибов рода *Psilocybe*. Содержание в них псилоцибина — основного действующего начала этого наркотика — обычно составляет от 0,2 до 2%, максимум 3%. Для проявления психотропных и галлюциногенных эффектов при приеме внутрь обычно используется псилоцибин в дозе 12–25 мг, что эквивалентно 0,6–12,5 г высушенных грибов.

Галлюциногенные эффекты и побочные соматические эффекты, связанные с приемом псилоцибина и его содержащих грибов, обусловлены действием основного метаболита этого алкалоида — псилоцина, который в организме человека взаимодействует с серотонинергическими (5-HT1A, 5-HT2C и т.д.) и норадренергическими рецепторами.

Большинство образцов, которые продаются на черном рынке под названием «псилоцин», состоит из различных компонентов. К продаваемым на улице грибам может быть добавлен ЛСД или фенциклидин.

Токсикокинетика и биотрансформация

Псилоцин и псилоцибин хорошо всасываются в тонком кишечнике.

Токсикокинетические характеристики псилоцибина (1) и псилоцина (2):

* pK~a~: 9,4 (1) и 10 (2); * T ~½~: 1,8–4,5 ч (1), нет данных (2); * V~d~: 2,5–5 л / кг (1), нет данных (2); * связывание с белками плазмы крови: нет данных; * выведение в неизмененном виде: нет данных.

Биотрансформация псилоцибина начинается в ЖКТ под действием щелочной фосфатазы и неспецифических эстераз слизистой оболочки кишечника. В молекуле псилоцибина расщепляется сложноэфирная связь с фосфорной кислотой. Далее псилоцин подвергается деметилированию, последовательному деаминированию и окислению до 4-гидроксииндол-3-уксусной кислоты под влиянием моноаминооксидаз

и ацетальдегиддегидрогеназы печени (рис. 6-27). Другие метаболиты псилоцибина — это 4-гидроксииндолацетальдегид, 4-гидрокситриптамин, 4-гидрокситриптофол. Выводится псилоцин главным образом в виде О-глюкуронида.

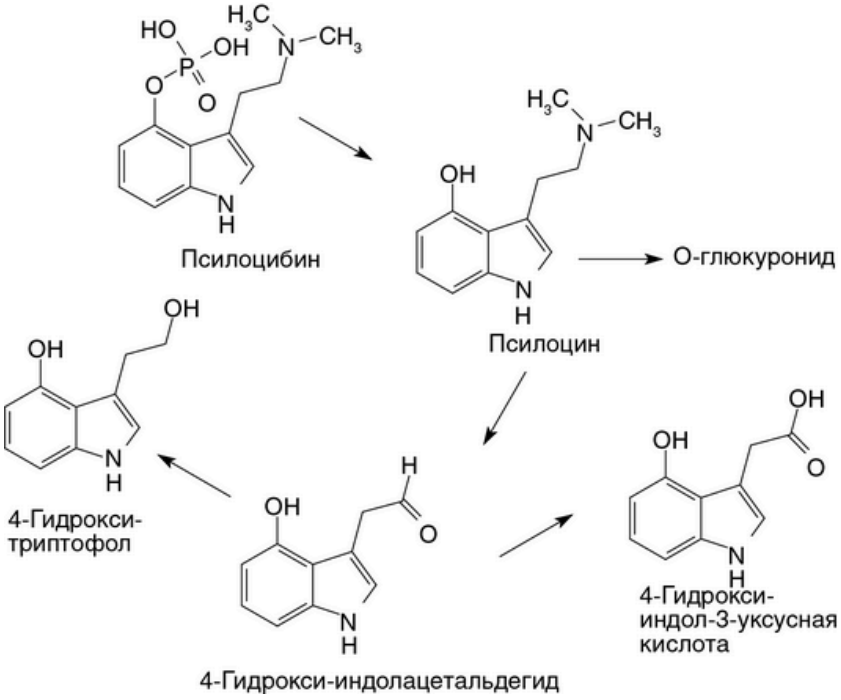


Рис. 6-27. Схема биотрансформации псилоцибина

Методы определения

Для исследования этих наркотиков в биожидкостях используют ИХМ, ГХ-МС, ВЭЖХ-МС, Фурье-ИК-спектрометрию.

Определение обсуждаемых галлюциногенов в растительном материале, напитках и других объектах при криминалистических исследованиях проводят, используя качественные цветные реакции, флуориметрию, ТСХ, ГХ, ГХ-МС, ВЭЖХ-МС.

6.3.6. Тимолептики и тимеретики

Грусть и разочарование еще больше,
чем распущенность, вредят нам,
счастливым обладателям надорванных сердец.

Винсент Ван Гог (1853–1890), выдающийся нидерландский и французский художник-постимпрессионист

Будем тверды в достижении цели
и мягки в средствах ее достижения.

«Наставления к излечению болезней души» — автор Клаудио Аквавива (1543–1615), перифраз латинского выражения: «По существу дела — твердо, по способам — мягко»

Первый трициклический антидепрессант имипрамин (тофранил) был получен в 1957 г. Geigy. Вскоре были синтезированы новые эффективные антидепрессанты, самый известный из которых амитриптилин. Применение этой группы лекарственных препаратов стремительно возросло в 60–70-х годах XX в., и они стали препаратами выбора для лечения депрессий. Однако в медицинской литературе появились данные об их токсичности, в особенности при передозировке. Хотя эти препараты назначаются часто, их использование остается одной из самых распространенных причин острого отравления во всем мире, нередко с летальным исходом.

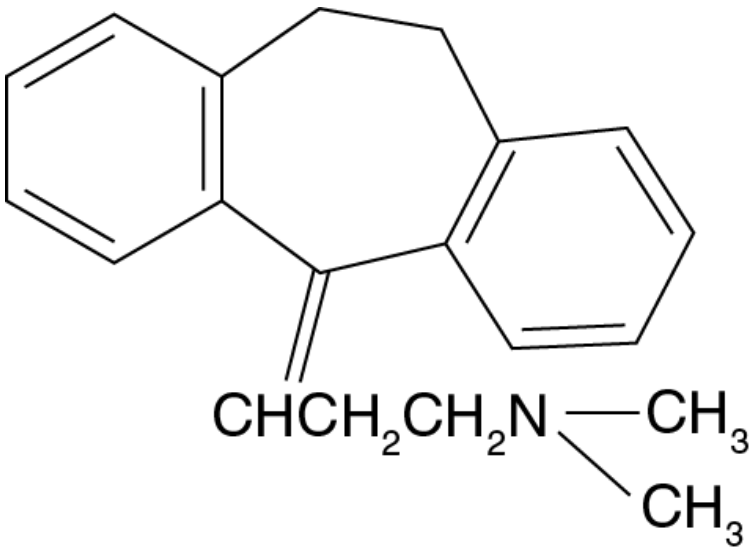
Антидепрессанты – сильнодействующие вещества, которые влияют на функционирование ЦНС и относятся к числу наиболее токсичных психотропных веществ. Общее свойство всех антидепрессантов — их тимолептическое действие, т. е. положительное влияние на аффективную сферу больного, сопровождающееся улучшением настроения и общего психического состояния.

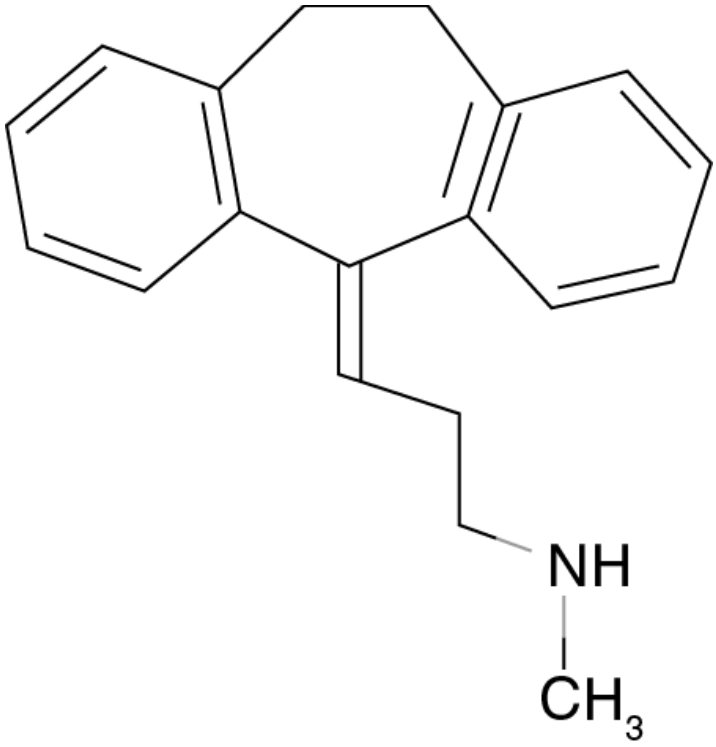
Существует много различных групп препаратов, обладающих антидепрессантным действием. Среди них можно выделить основные:

* избирательные ингибиторы моноаминоксидазы; * антидепрессанты трициклической структуры:
 1) имипраминовый тип (имипрамин и кломипрамин);
 2) амитриптилиновый тип (амитриптилин, доксепин, опипрамол, тримипрамин);
 3) дезипраминовый тип (дезипрамин, нортриптилин); * избирательные ингибиторы обратного нейронального захвата серотонина, или селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (ИОНЗС-флуоксетин, пароксетин или СИОЗС); * ингибиторы нейронального захвата только норадреналина (ИОЗН-мапротилин); * селективные ингибиторы нейронального обратного захвата серотонина и норадреналина (СИОЗСН – венлафаксин).

Некоторые представители различных групп антидепрессантов представлены в табл. 6-13.

Таблица 6-13. Антидепрессанты различных химических групп

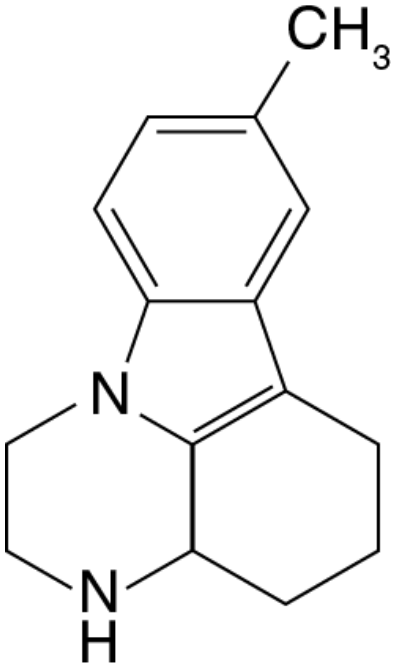
Группа веществ	**Химическая структура, биотрансформация и выведение, эффективная и летальная доза**
Антидепрессанты трициклической структуры	Амитриптилин  Метаболизируется до нортриптилина и динортриптилина (дезметилнортриптилина). 35% введенной дозы выделяется с мочой за 24 ч в виде метаболитов, за 11 дней выводится почти 80% дозы и только 0,2% препарата выводится в неизмененном виде. ЭД = 150 мг; ЛД = более 300 мг/сут Нортриптиллин



Нортриптилин является активным метаболитом амитриптилина, который деметилируется в печени. Как ЛС в России не зарегистрирован. Нортриптилин метаболизируется в печени при помощи печеночного фермента CYP2D6.
ЭД = 100 мг; ЛД = более 200 мг/сут

Пиразидол (пирлиндол)

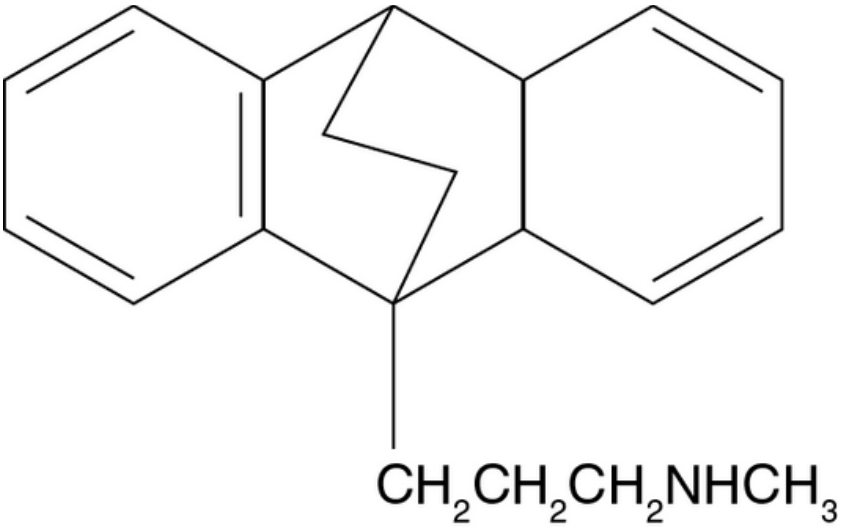
Избирательные ингибиторы моноаминоксидазы



Пирлиндол является оригинальным российским препаратом. Пирлиндол почти полностью метаболизируется и только очень незначительное его количество выводится с мочой в неизмененном виде. Из организма около 50–70% метаболитов выводятся с мочой, 25–45% — с желчью через кишечник. Фармакологически активным метаболитом является дегидропирлиндол.
ЭД = 150 мг; ЛД = более 600 мг/сут

Ингибиторы нейронального захвата только норадреналина

Мапротилин («Людиомил»)

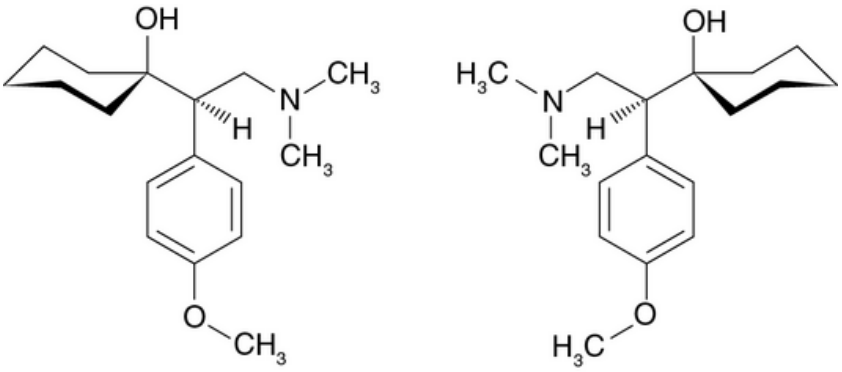


Выводится в течение 21 дня с мочой (57%) и фекалиями (30%), в основном в виде метаболитов, около 6% выводится с мочой в неизмененном виде. Метаболитами являются продукты N-деметилирования, дезаминирования, гидроксилирования и конъюгации

ЭД = 75 мг; ЛД = более 300 мг/сут

Венлафаксин

СИОЗСН — селективные ингибиторы обратного захвата серотонина и норадреналина

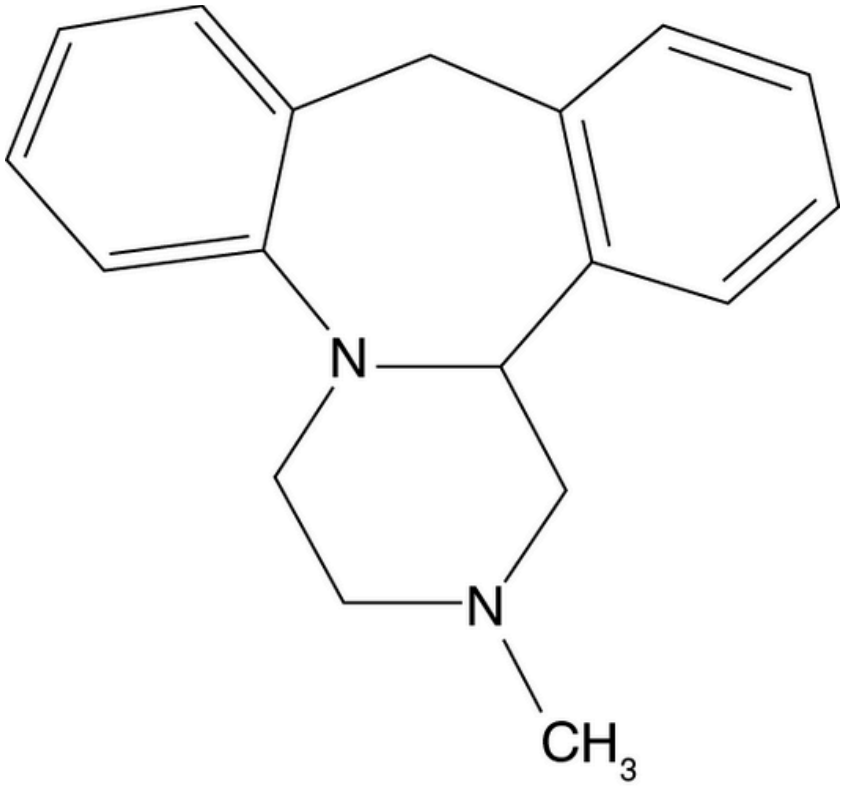


Метаболизируется главным образом с образованием единственного фармакологически активного метаболита (ОДВ), а также нескольких неактивных — N-дезметилвенлафаксин, N,O-дидезметилвенлафаксин и др.

ЭД = 125 мг

Атипичные антидепрессанты

Миансерин



Препарат интенсивно метаболизируется путем N-деметилирования, N-окисления и 8-гидроксилирования. 64—74% дозы выводится с мочой в первые несколько дней, в основном в виде метаболитов, только 5% выводится в неизмененном виде.
ЭД = 20 мг; ЛД = 90 мг/сут

Фармакология и токсикология

Антидепрессанты — лекарственные средства, уменьшающие проявления депрессии. Они действуют за счет вызываемого ими накопления серотонина и норадреналина в ЦНС, то есть либо предотвращают обратный захват этих нейромедиаторов пресинаптической мембраной, либо препятствуют их разрушению в синаптической щели.

Трициклические антидепрессанты получили название из-за наличия характерной трехциклической структуры. Механизм их действия связан с угнетением обратного захвата нейромедиаторных моноаминов пресинаптическими нервными окончаниями, в результате чего происходит накопление медиаторов в синаптической щели и активация синаптической передачи. Трициклические антидепрессанты, как правило, одновременно уменьшают захват разных нейромедиаторных аминов (норадреналина, серотонина, дофамина).

В дальнейшем были получены антидепрессанты второго поколения: тразодон, мапротилин, амоксапин и др. Несмотря на отличия их структуры от строения трициклических антидепрессантов, они имеют близкое фармакологическое действие и параметры токсичности с трициклическими антидепрессантами. Третье поколение антидепрессантов — избирательные (селективные) ингибиторы обратного нейронального захвата серотонина — наиболее эффективные препараты, обладающие значительно меньшей токсичностью при передозировке, например флуоксетин (прозак), сертралин, пароксетин, циталопрам, эсциталопрам и др.

Существуют так называемые атипичные антидепрессанты, отличающиеся от типичных как по структуре, так и по механизму действия. Появились препараты би- и четырехциклической структуры, у которых не обнаружено выраженного влияния ни на захват нейромедиаторов, ни на активность моноаминоксидазы (миансерин и др.).

Антидепрессанты различаются по «составляющим» фармакологических свойств. Так, у имипрамина и некоторых других антидепрессантов тимолептический эффект сочетается со стимулирующим, а у амитриптилина, кломипрамина, тримипрамина, доксепина более выражен седативный компонент. У мапротилина антидепрессивное действие сочетается с анксиолитическим и седативным. Ингибиторы моноаминоксидазы (ниаламид, эпробемид) обладают стимулирующими свойствами. Пирлиндол, снимая симптоматику депрессии, проявляет ноотропную активность, улучшает когнитивные (познавательные) функции ЦНС.

Прием трициклических антидепрессантов (амитриптиллина) связан с повышенным риском суицидальных мыслей. Высокие концентрации антидепрессантов коррелируют со степенью тяжести отравления. При неоказании или несвоевременном оказании помощи возможен летальный исход.

Токсикокинетика и биотрансформация

Токсикокинетика и биотрансформация трициклических антидепрессантов активно изучались многие годы, в особенности амитриптилина и имипрамина и их метаболитов нортриптилина и дезипрамина соответственно. Эти соединения, как правило, хорошо всасываются из ЖКТ, и в силу высокой растворимости в липидах концентрация их в крови и плазме значительно ниже, чем в тканях. Объемы распределения веществ соответственно высокие и составляют 20–40 л/кг. После приема внутрь эти вещества активно метаболизируются в печени, в основном путем N-деметилирования и гидроксилирования и последующей конъюгацией с глюкуроновой кислотой, и выделяются с мочой.

Основные пути метаболизма имипримина и образование его двух основных метаболитов показаны на рис. 6-28.

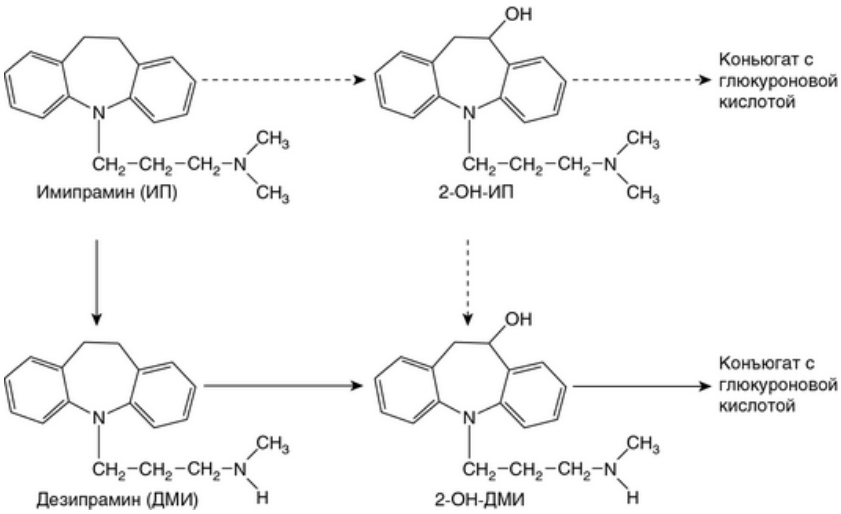


Рис. 6-28. Схема биотрансформации имипрмина

На рис. 6-29. показана схема биотрансформации мапротилина.



Рис. 6-29. Схема биотрансформации мапротилина

T~1/2 ~большинства трициклических антидепрессантов составляет от 0,5 до 2,0 дня, хотя у некоторых пациентов, в особенности пожилого возраста, наблюдается период полуэлиминации, превышающий
2 дня. При повторном назначении лекарственных веществ концентрации в плазме достигают стадии плато, так называемой стационарной концентрации. Время достижения стационарной концентрации зависит от величины T~1/2~; 90% стационарной концентрации достигается за 3,5 периода полуэлиминации и для большинства людей составляет 5–7 дней. У пациентов с медленным или нарушенным гидроксилированием стационарные концентрации лекарственного вещества или его активных метаболитов могут не достигаться и за несколько недель, поэтому возникает высокая вероятность замедленных токсических эффектов.

Методы определения

Основные направления использования методов определения антидепрессантов следующие:

* токсикология неотложных состояний; * контроль при лечении; * исследование побочных эффектов; * судебно-химическая экспертиза и химико-токсикологические исследования.

Пробоподготовка

Основной объект для скрининг-анализа при химико-токсикологических и судебно-химических исследованиях — моча, но следует заметить, что важно провести исследования крови на присутствие принятого вещества, поскольку в случае отравления антидепрессантами терапевтическая концентрация может не сильно отличаться от токсической.

Обязательно следует учитывать стабильность вещества и его метаболитов при транспортировке и хранении образцов до проведения исследования. Трициклические антидепрессанты стабильны несколько дней даже при комнатной температуре. Однако для некоторых более новых антидепрессантов характерно превращение неустойчивого метаболита —N-глюкуронида в исходное вещество.

Для полноты извлечения веществ используют различные методики. В большинстве способов ЖЖЭ биообразец помещают в щелочную среду, потом экстрагируют в относительно неполярный органический растворитель, например н-гексан или хлороформ, после этого вещество еще раз экстрагируют в небольшой объем кислоты и определяют его напрямую методом ВЭЖХ или реэкстрагируют в небольшой объем органического растворителя для анализа с помощью ГХ. В последнее время ТФЭ заменила ЖЖЭ.

Существует метод изолирования и экстракции из мочи с использованием готовых экстракционных флаконов TOXI-PROBES, имеющих комбинированный экстрагент, и позволяющих проводить одновременно с экстракцией очистку проб.

Тонкослойная хроматография

ТСХ после ТФЭ или ЖЖЭ из мочи или содержимого желудка — до сих пор широко применяемый метод ориентировочной оценки, который может быть использован для обнаружения антидепрессантов. Применяются различные системы растворителей. Детекция антидепрессантов может быть выполнена при использовании таких реактивов, как реактив Драгендорфа (по Мунье), пары йода (кристаллический йод помещают в эксикатор и распыляют в камере), раствор йодплатината подкисленного и реактив Манделина (ванадат аммония, концентрированная серная кислота). Реактив Манделина является относительно более специфичным и чувствительным для определения трициклических антидепрессантов, близких к имипрамину или амитриптилину. Некоторые вещества, например амитриптилин и нортриптилин, дают характерные цвета при просмотре в УФ-свете.

Методы ГЖХ-МС, ВЭЖХ-МС, КЭФ-МС применяют для качественного и количественного определения антидепрессантов.

Иммунохимические методы

Применение методов EMIT и FPIA (см. п. 5.2) для определения антидепрессантов имеют серьезные ограничения, в особенности для антидепрессантов второго и третьего поколения.

Экспрессное определение трициклических антидепрессантов, основанное на FPIA, успешно применяется для установления факта передозировки. FPIA, как и метод EMIT, имеет ограничения из-за кросс-реактивности с другими антидепрессантами.

Часто возникают судебно-химические и клинические ситуации, когда один из методов имеет преимущество или есть необходимость использовать несколько методов. Например, иногда сложно различить смеси некоторых антидепрессантов и их метаболитов с помощью ВЭЖХ, особенно в тех случаях, когда был принят более чем один антидепрессант. Наоборот, с помощью ГХ, в особенности капиллярной ГХ, намного лучше разделяются сложные смеси антидепрессантов. ИХМ анализа дополняют хроматографические.

Газовая хроматография

ГХ до сих пор остается достаточно распространенным методом количественного определения антидепрессантов, в особенности с использованием капиллярных колонок (типа HP-5MS) и масс-селективного детектора.

Один из недостатков метода в том, что он не может быть использован без предварительной дериватизации полярных гидроксилированных метаболитов, однако дериваты антидепрессантов с группировкой вторичного амина в боковой цепи, полученные с помощью трифторуксусного ангидрида, хорошо идентифицируются этим методом. В настоящее время основным методом определения антидеперссантов является ВЭЖХ с УФ-детектированием как при относительно больших длинах волн (254 нм), так и при более коротких (210–215 нм). На рис. 6-30 и 6-31 представлены результаты ГХ-МС исследования экстрактов мочи людей, употреблявших амитриптилин.

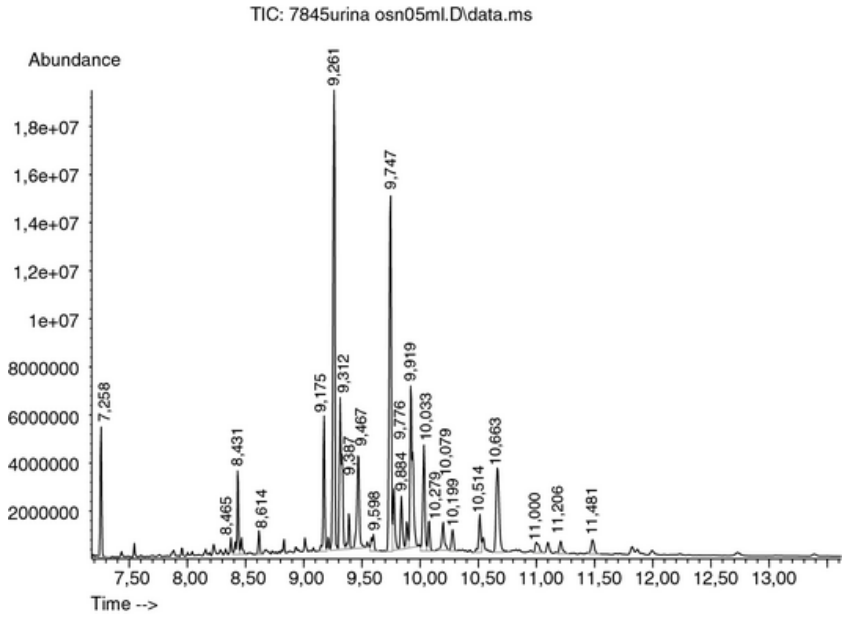


Рис. 6-30. Фрагмент хроматограммы образца мочи с токсической концентрацией нортриптилина (активный метаболит амитриптилина).

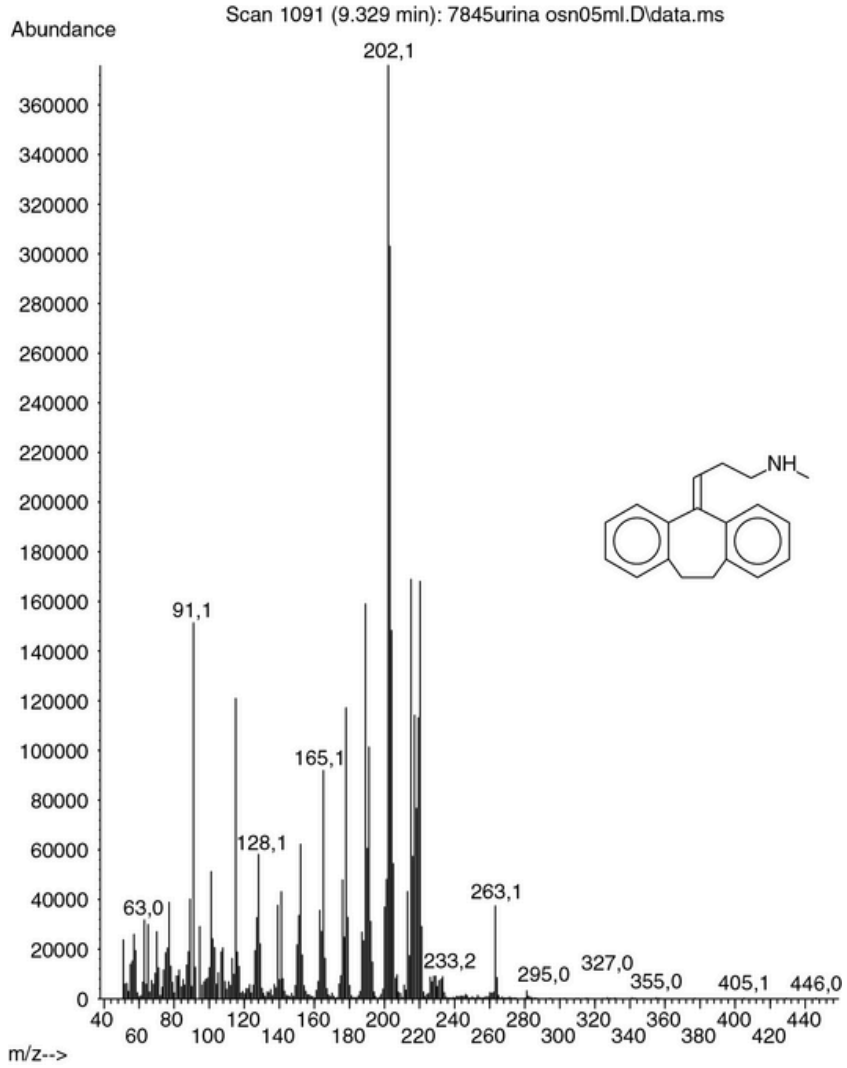


Рис. 6-31. Масс-спектр нортриптиллина, Rt = 9,32 мин

Среди группы трициклических антидепрессантов, которые до сих пор занимают первое место по назначениям больным, следует выделить *тианептин* (*Коаксил, Tianeptine , Stablon^®^, Coaxil^®^, Tatinol^®^*) в связи с тем, что в настоящее время многие наркоманы используют его как заменитель опиатов (рис. 6-32). В дозах, в 10 раз и более превосходящих терапевтичекие, препарат приводит к сильному героиноподобному действию с быстро развивающейся зависимостью.

Наркоманы часто употребляют коаксил внутривенно, что вызывает тяжелые тромбозы и тромбофлебиты, нередко приводящие к гангрене и последующей ампутации конечности. При внутривенном приеме возможен летальный исход от тромбоэмболиии.

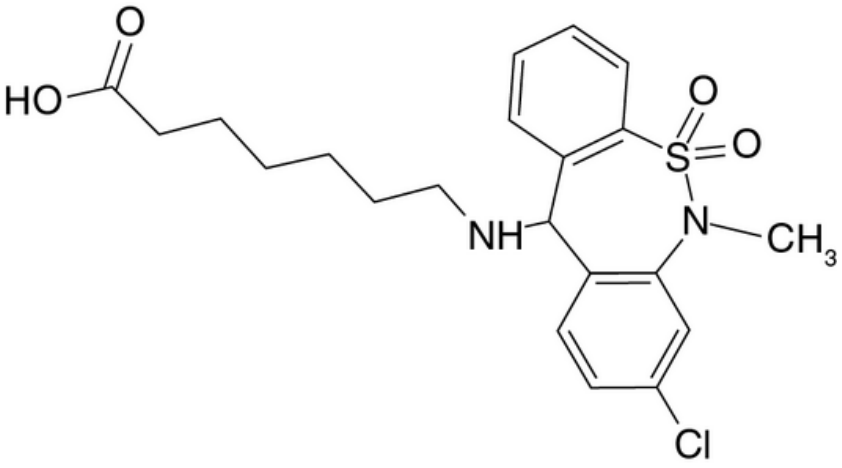


Рис. 6-32. Структурная формула коаксила

Препарат в лечебных целях принимают внутрь в дозах 12,5 мг 2–3 раза в сутки. После приема внутрь быстро и полностью всасывается из ЖКТ. Связывание с белками крови – 94%. Равномерно распределяется в организме, легко проходит через гистогематические барьеры. В печени подвергается β-окислению и N-деметилированию. T~1/2~ 2,5±1,1 ч. Выводится почками преимущественно в виде метаболитов и только около 8% в неизмененном виде.

6.3.7. Барбитураты

Сострадание есть главнейший и, может
быть, единственный закон бытия всего
человечечства.

Федор Михайлович Достоевский (1821–1881),
великий русский писатель, мыслитель,
философ, публицист,
член-корреспондент Петербургской АН,
классик мировой литературы

Название «барбитураты» объединяет группу веществ, имеющих близкое химическое строение и оказывающих различные виды действия на ЦНС — от легкого седативного до общей анестезии. Некоторые из них обладают противосудорожной активностью. Практически все представители этой группы соединений являются депрессантами ЦНС. Прием их может вызвать эйфорию, подобную морфиновой, но они практически не обладают болеутоляющим свойством. У некоторых людей прием барбитуратов при наличии болевых симптомов может привести к парадоксальным эффектам.

В медицинской практике барбитураты используют:

* как снотворные и седативные препараты; * при лечении эпилепсии в качестве антиконвульсантов; * как внутривенные анестезирующие средства, чаще всего тиопентал; * в качестве антагонистов для подавления побочного действия стимуляторов, например эфедрина.

Синтезировано около 2500 различных веществ этой группы, более 60 из них ранее широко применялись в медицине. В последние десятилетия терапевтическое значение барбитуратов постепенно снижается за счет появления новых более эффективных, безопасных, обладающих меньшей толерантностью лекарств, например бензодиазепинов. Сегодня используются 20–25 барбитуратов и комбинированных лекарственных средств — смесей барбитуратов (например, амобарбитал и секобарбитал) или смесей с другими веществами (кофеином, эфедрином и др.).

В незаконном обороте наркотиков нередки случаи использования барбитуратов для увеличения массы наркотического средства, например кокаина или героина, или коррекции его действия, а также в смеси с алкоголем.

В соответствии с Конвенцией ООН о психотропных веществах 1971 г. международному контролю подвергается 12 барбитуратов: аллобарбитал, амобарбитал (барбамил), барбитал, бутабарбитал, буталбитал, циклобарбитал, метилфенобарбитал, пентобарбитал, этаминал-натрий, фенобарбитал, секбутабарбитал, секобарбитал и винилбитал.

Барбамил и этаминал-натрий (пентобарбитал)Пентобарбитал — лактамная форма, а этаминал-натрий — соль лактимной формы одного и того же вещества. включены в Список II Перечня. Гексобарбитал и тиопентал натрия включены в список сильнодействующих веществ. Большинство барбитуратов – лекарственных средств включены в Список III Перечня.

Структура некоторых токсикологически значимых барбитуратов приведена на рис. 6-33 и в табл. 6-14.

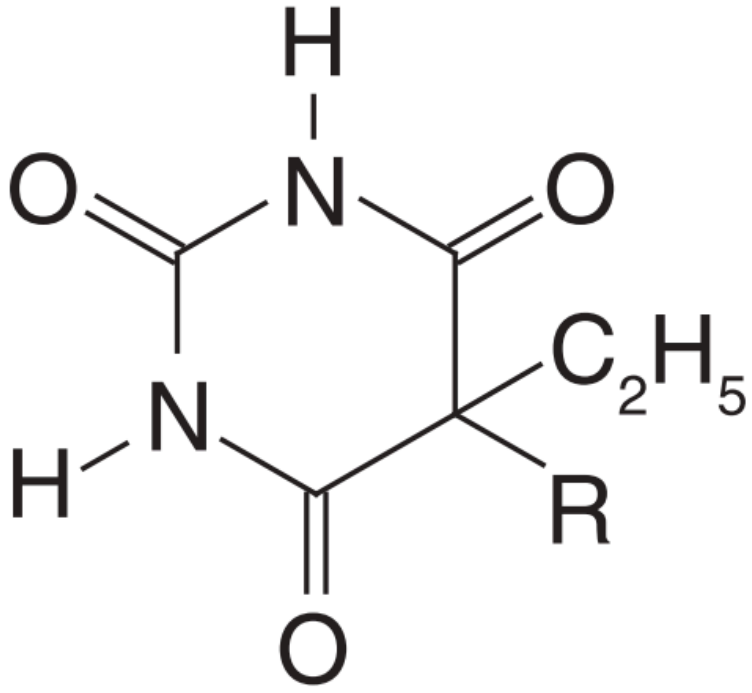
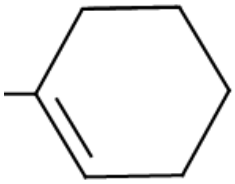


Рис. 6-33. Структурная формула барбитуратов

Таблица 6-14. Структура некоторых токсикологически значимых барбитуратов

Барбитурат	R
Барбитал	–C~2~H~5~
Фенобарбитал	–C~6~H~5~
Циклобарбитал	
Барбамил (амобарбитал)	–CH~2~–CH~2~–CH(CH~3~)~2~
Этаминал (пентобарбитал)	–CH(CH~3~)–C~3~H~7~

Родоначальником этой группы веществ является барбитуровая кислота, образующаяся при взаимодействии мочевины и малоновой кислоты. При замене двух атомов водорода при C~5~ различными радикалами получаются 5,5´-дизамещенные барбитуровой кислоты — барбитураты.

Тиобарбитураты — это производные барбитуровой кислоты, у которых атом кислорода карбонильной группы при C~2~ замещен серой.

Физико-химические свойства. Производные барбитуровой кислоты растворимы в большинстве органических растворителей (этиловый эфир, этилацетат, хлороформ, метанол), но нерастворимы в воде.

Для барбитуратов возможна только *лактим-лактамная таутомерия* в отличие от барбитуровой кислоты, для которой характерны кето-енольная и лактим-лактамная таутомерия. Спиртовые растворы лактимных форм барбитуратов имеют кислую реакцию среды. Барбитураты легко образуют *водорастворимые соли* с одним эквивалентом щелочи. Натриевые соли производных барбитуровой кислоты нерастворимы в эфире, этилацетате и хлороформе. В виде натриевых солей используют амобарбитал, пентобарбитал, фенобарбитал, секбутабарбитал и секобарбитал. Иногда циклобарбитал применяют в виде кальциевой соли.

Фармакология и токсикология

По длительности снотворного действия выделяют барбитураты *длительного действия* (веронал, фенобарбитал), *средней продолжительности действия* (амобарбитал, циклобарбитал), *короткого действия* (гексобарбитал), *ультракороткого действия* (секобарбитал).

Пентобарбитал, секобарбитал и фенобарбитал в дозах ниже снотворных оказывают седативное действие. Однако из-за очень узкого терапевтического индекса и быстрого развития толерантности в качестве седативных средств они используются редко.

Эффективными анестезирующими средствами являются 5,5′-диалкилбарбитураты, метилированные по азоту в положении 1, при этом один из заместителей в положении 5 должен быть ненасыщенным. На продолжительность анестезии оказывает большее воздействие не биотрансформация вещества, а быстрое его перераспределение из хорошо снабжаемых кровью тканей мозга в мышцы и жировые ткани. *Равновесие между концентрацией вещества в плазме крови и жировой тканью достигается обычно спустя длительное время,* например, для тиобарбитуратов только после 1,2–2 ч. Повторная инъекция рискованна из-за возможности накопления вещества, ведущей к передозировке. Обычно барбитураты используют в смеси с ингаляционными анестезирующими средствами. В настоящее время барбитураты применяют при вводном наркозе и местных операциях.

Механизм действия. Барбитураты угнетают ретикулярную активирующую систему — разветвленную полисинаптическую сеть нейронов и регуляторных центров ствола мозга. Барбитураты подавляют эффекты возбуждающих нейротрансмиттеров (например, АХ) и стимулируют эффекты ингибирующих нейротрансмиттеров (например, ГАМК). Специфические механизмы включают влияние на пресинаптическое выделение нейротрансмиттера и постсинаптическое стереоселективное взаимодействие с рецепторами. Барбитураты являются агонистами рецепторов ГАМК — одного из основных нейротрансмиттеров.

Длительное употребление барбитуратов или употребление их вместе с другими веществами, действующими на ЦНС, например наркотиками или алкоголем, приводит к индукции ферментов, отвечающих за их метаболизм (см. гл. 3). Этим обусловлено развитие *толерантности*. Она развивается обычно в период от нескольких недель до месяцев при постоянном приеме и сопровождается усилением токсического действия препарата.

Прием барбитуратов ***в больших дозах*** оказывает наркотическое опьяняющее действие, подобное алкогольному. Признаки его включают эйфорию с эмоциональной неустойчивостью, вспыльчивостью, расторможенностью и агрессивностью. Другие признаки: гиперемия кожных покровов и склер, гипотония, брадикардия, снижение температуры тела, тонкий коричневатый, спаянный с эпителием налет на языке, гипосаливация, угнетение безусловных вегетативных рефлексов, мидриаз, расстройства координации, мышечная слабость, атактические расстройства — неуверенность походки, пошатывание при ходьбе, падения, неточные, порывистые, размашистые движения, множество лишних движений. Завершается опьянение общей слабостью и сном.

Барбитуровая абстиненция характеризуется развитием тяжелых, опасных для жизни расстройств. Абстинентный синдром развивается в течение 1-х суток с момента последнего приема снотворного. Длительность абстиненции до 4–5 нед. Наибольшая интенсивность ее проявлений и физического влечения от 3 до 14 сут.

Основные симптомы барбитуромании:

* отсутствие снотворного действия терапевтических доз, потребность в увеличении снотворной дозы; нарушения сна (укороченный поверхностный сон) вне приема препарата; * психический дискомфорт вне приема барбитуратов (неудовлетворенность, пониженное настроение, навязчивые мысли, страхи, астения с непереносимостью звуков, шумов, света); * потребность в регулярном приеме; утренний, дневной прием барбитуратов; * знакомство с тонизирующим или эйфорическим действием барбитуратов, происходящее при увеличении разовой дозы до 0,4–0,6 г.

Острая токсичность от приема барбитуратов приводит к нарушению ЦНС, включая суженные зрачки, замешательство, гипотензию, слабую координацию, угнетение дыхания, летаргию и кому. Обычно диагноз о серьезной передозировке ставится на основании клинических проявлений, так как определение концентрации

барбитурата или его метаболитов в крови мало показательно из-за длительного установления равновесия концентраций вещества в крови и тканях.

Токсикокинетика и биотрансформация

Все заместители в структуре барбитурата оказывают значительное влияние на его распределение в организме. Например, значения p*K~a~* барбитуратов, обладающих снотворным действием, располагаются в пределах 7,78–8,30, т. е. при физиологических значениях pH (около 7,4) эти вещества примерно на 50% недиссоциированы и легко проходят через различные барьеры организма, оказывая воздействие.

Как снотворные средства, все барбитураты оказывают близкое фармакодинамическое действие на организм человека. Однако у них наблюдаются значительные различия в фармакокинетике и путях биотрансформации, которые связаны с липофильностью и скоростью биотрансформации конкретного вещества. Липофильные барбитураты, например наркотически активные тиобарбитураты или N-моноалкилбарбитураты типа гексобарбитала, в результате перераспределения в липофильных компартментах имеют очень короткую продолжительность действия. Кроме того, продолжительность действия этих веществ в значительной степени зависит от скорости их энзиматического разрушения в печени, в свою очередь зависящую от их структуры.

Практически все барбитураты биотрансформируются до неактивных метаболитов, которые затем выводятся с мочой. Известно четыре основных пути биотрансформации этих веществ:

* окисление заместителей при C~5~ с образованием спиртов, фенолов, кетонов и карбоновых кислот с последующим частичным преобразованием их в глюкурониды; * деалкилирование N-алкильных групп; * десульфулирование тиобарбитуратов; * раскрытие барбитурового кольца между N~1~- и C~6~-атомами.

На рис. 6-34 приведены основные пути биотрансформации барбитуратов.

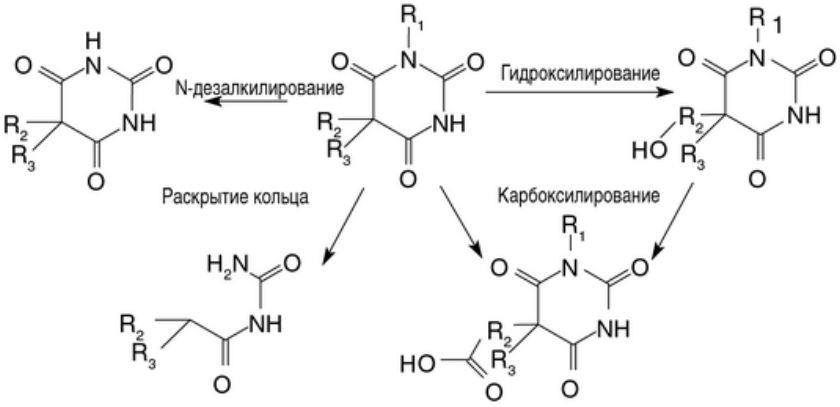


Рис. 6-34. Основные пути биотрансформации барбитуратов

При исследовании барбитуратов могут возникнуть дополнительные задачи, решение которых зависит от знания возможных путей биотрансформации различных представителей этой группы веществ. Например, при обнаружении в моче пентобарбитала следует установить возможное присутствие тиопентала, который в ходе реакции десульфирования может превращаться в пентобарбитал (рис. 6-35).

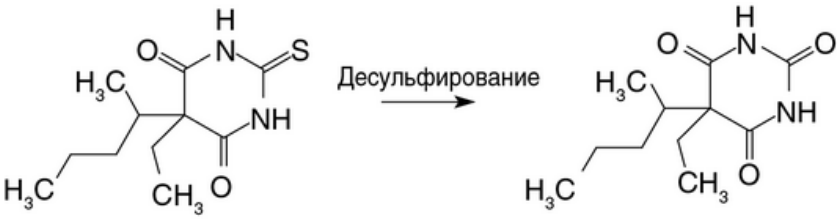


Рис. 6-35. Реакция десульфирования тиопентала

В табл. 6-15 представлены токсикокинетические характеристики некоторых барбитуратов.

Таблица 6-15. Токсикокинетические характеристики некоторых барбитуратов

Барбитурат	p*K~a~*	*T* ~½~, ч	*V~d~*, л / кг	Выведение в неизмененном виде*, %	Связывание с белками плазмы крови, %
Барбитал	7,8	48–72	0,5	90–95	2
Фенобарбитал	7,3	50–150	0,5	25–35	50
Циклобарбитал	7,6	8–17	0,5	2–6	70
Барбамил (амобарбитал)	7,9	8–40	1,0	1–3	40–60
Этаминал (пентобарбитал)	8,0	15–48	0,7–1,0	10	60–70

* При передозировке количество неизмененного вещества в моче может быть больше приведенного в таблице.

Интерпретация результатов определения концентрации барбитуратов в плазме крови обычно проводится с осторожностью, так как их токсические эффекты зависят от большого числа факторов, включающих индивидуальные особенности организма (генетические, см. гл. 2 и 3), степень толерантности или наличие в организме других психоактивных веществ (например, этанола, наркотиков или бензодиазепинов), заболевания кардиоваскулярной или дыхательных систем. Эти факторы обычно повышают концентрацию барбитурата до токсической. Так, при лечении эпилепсии фенобарбиталом из-за быстро развивающейся толерантности терапевтические концентрации вещества в плазме крови близки или превышают токсические. При этом исследование мочи мало показательно с точки зрения установления дозы и фармакологического эффекта барбитурата. Путь введения препарата также влияет на концентрацию вещества в плазме крови. В табл. 6-16 приведены ориентировочные концентрации некоторых барбитуратов в плазме крови.

Таблица 6-16. Терапевтические и токсические концентрации некоторых барбитуратов в плазме крови

Вещество	Максимальная терапевтическая концентрация, мг / л	Минимальная токсическая концентрация, мг / л
Аллобарбитал	40	50
Амобарбитал	12	10
Барбитал	30	20
Буталбитал	10	10
Бутабарбитал	15	14
Циклобарбитал	10	8
Метилфенобарбитал	15	40
Пентобарбитал	10	5
Фенобарбитал	40	3
Секбутабарбитал	14	20
Секобарбитал	10	10
Винилбитал	10	5

Методы определения

Время детектирования барбитуратов в биологических жидкостях, главным образом в моче, изменяется в значительных пределах. Это зависит от ряда причин: принятой дозы и продолжительности употребления (хронической или острой интоксикации), совместного употребления веществ, стимулирующих или подавляющих метаболические превращения (особенностей токсикокинетики), используемого метода обнаружения конкретного определяемого вещества, pH мочи. Производные барбитуровой кислоты короткого действия, например пентобарбитал и секобарбитал, могут быть обнаружены в моче в течение 24 ч вещества длительного действия, такие как фенобарбитал, — в течение 14 дней и более. В других объектах период детектирования может быть более продолжительным, например, в волосах барбитураты обнаруживаются после разовой терапевтической дозы спустя 6 мес и более.

В число наиболее широко применяемых методов для определения барбитуратов входят химические (хромогенные реакции), иммунохимические тесты, УФ-ВИД-спектрофотомерия, ИК-Фурье-спектрометрия, ТСХ, ГХ и ВЭЖХ, а также гибридные методы: ГХ-МС и ГХ-ИК — Фурье-спектрометрия, ВЭЖХ-МС. До недавнего времени для анализа барбитуратов широко использовались методы микрокристаллоскопии, однако в настоящее время они практически не применяются.

Выбор конкретного способа пробоподготовки и метода определения зависит от целей и задач исследования (СХА, КТА и др.), типа образца, представленного на исследование (например, неизвестный порошок или моча и волосы человека), наличия оборудования. Исследование биологических объектов обычно осуществляется ИХМ, ТСХ, методами ГХ-МС или ВЭЖХ-МС.

Хромогенные реакции. Применяют хромогенные реакции с различными реактивами.

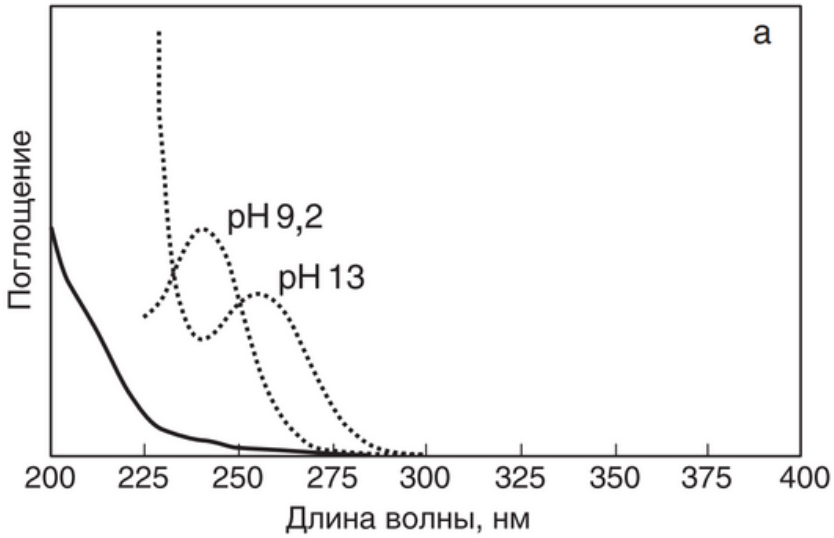
Иммунохимические тесты. Результаты, получаемые при исследовании барбитуратов с помощью ИХМ, позволяют сделать предположение о возможном наличии в тестируемом объекте вещества из группы барбитуратов без проведения внутригрупповой дифференцировки. Продолжительность исследования обычно составляет от нескольких минут до нескольких часов (см. п. 5.2).

В настоящее время большинство тестов ориентировано на проведение исследований мочи, также известны тесты и по определению барбитуратов в крови, слюне, поте. Для барбитуратов предел обнаружения в моче составляет от 100 до 500 нг / мл в зависимости от используемого оборудования при тестировании.

ТСХ широко используется для исследования барбитуратов и их метаболитов, проведения скрининга. Этот вид хроматографии полезен в качестве препаративного метода.

УФ-спектрофотометрия. Используется для идентификации и количественного определения барбитуратов, в том числе выделенных из биологических объектов. В растворах барбитураты в зависимости от pH среды изменяют характер поглощения УФ-света. В органических растворителях при кислой реакции среды поглощение барбитуратов незначительно. Однако при изменении pH в их спектрах появляются интенсивные полосы поглощения вследствие лактим-лактамной таутомерии перехода лактамной формы барбитурата в лактимную при pH 9,0 (по N~1–~C~2~) и при pH 13,0 (по N~1–~C~2 ~и по N~3–~C~4~).

Все 5,5-дизамещенные барбитураты в указанных условиях имеют максимум поглощения при pH 9,0 близкий к 240 нм, при изменении pH до 13,0 интенсивность их поглощения снижается. При этом происходит сдвиг в более длинноволновую область, к 255 нм. На рис. 6-36, *а* показаны спектры поглощения фенобарбитала в зависимости от pH среды. У N-замещенных барбитуратов, например метилфенобарбитала, может быть только одна лактимная форма, и его раствор (pH 9,0) имеет на УФ-спектре только один максимум поглощения при 243–244 нм (рис. 6-36, *б*). Повышение pH до 13,0 к изменению спектра не приводит. Тиобарбитураты обладают высокой способностью к поглощению УФ-света (рис. 6-36, *в*). Максимум поглощения в сильнощелочной среде у них составляет 303–304 нм.



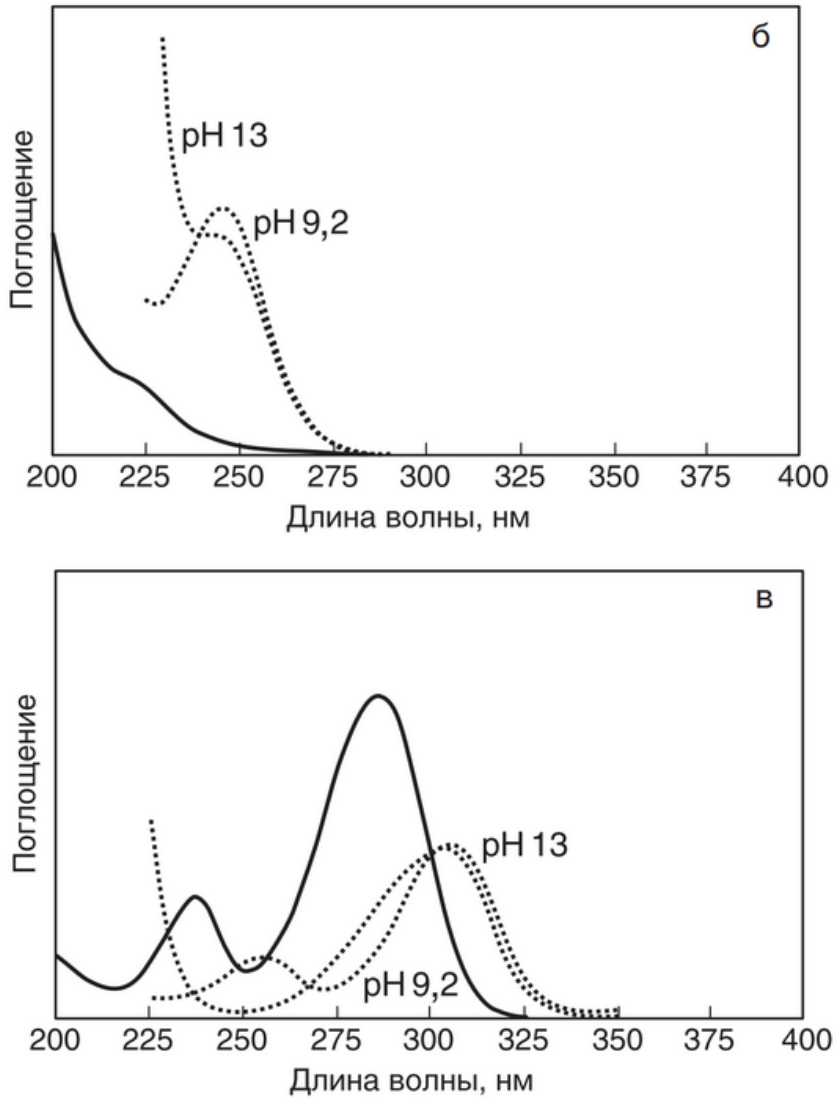


Рис. 6-36. Ультрафиолетовые спектры фенобарбитала (*а*), метилфенобарбитала (*б*) и тиопентала (*в*) в зависимости от pH среды (пояснения в тексте)

УФ-спектрофотометрию используют для количественного определения барбитуратов в моче и крови. Окисленные в алифатической части метаболиты барбитуратов имеют очень близкие спектры к исходным барбитуратам, поэтому результат определения — это суммарная концентрация исходного вещества и его основных метаболитов.

Продукты реакции барбитуратов с дифенилкарбазоном и солями ртути поглощают УФ-свет при 550 нм. Эту реакцию используют для определения барбитуратов фотоколориметрическим способом (при концентрациях барбитуратов в плазме крови в диапазоне от терапевтических до токсических).

ИК-Фурье-спектрометрия. Применяют для идентификации индивидуальных барбитуратов (примеры см. п. 5.4.2.2). Метод недеструктивен и достаточно просто комбинируется с другими методами, например с ТСХ, обладает достаточно высокой чувствительностью: современные ИК-Фурье-спектрометры способны снимать спектры образцов вещества массой до 10 мкг, а при использовании специальных приспособлений — и гораздо ниже.

Основные характеристические частоты ИК спектров барбитуратов (см^–1^):

–NH– (деформационные колебания): 1680–1693;

–C=O (валентные колебания): 1712–1725;

–CONH– (валентные колебания): 1744–1770;

=C–N– (валентные колебания): 1300–1320;

C=O (деформационные колебания): 1210–1245;

= C—H (деформационные колебания): 830–875.

Дополнительно тиогруппа может быть идентифицирована по двум полосам поглощения — 1170 и 1540 см^–1^, аллильные радикалы — по полосам 1000 и 1540 см^–1^, N-метильные радикалы — по двум полосам около 1190 см^–1^, фенильные заместители в положении 5 имеют полосы 1490 см^–1^ и между 690 и 715 см^–1^.

Все барбитураты могут быть идентифицированы в области «отпечатков пальцев».

ГХ и хромато-масс-спектрометрия. Метод ГХ широко используют при исследовании барбитуратов, в том числе выделенных из биологических объектов. Современные капиллярные кварцевые газохроматографические колонки с нанесенными на стенки неполярными силиконовыми фазами достаточно инертны и позволяют проводить исследования *следовых количеств барбитуратов без дериватизации*. Однако в некоторых случаях, например, при проведении подтверждающего исследования методом хромато-масс-спектрометрии или при исследовании метаболитов барбитуратов *предварительно проводят дериватизацию*. С этой целью используют метилирующие реактивы, такие как диазометан, гидроксиды тетраметиламмония или триметилфениламмония. В результате их действия атомы водорода у азота в молекуле барбитурата меняются на метильную группу. При исследовании *метаболитов барбитуратов* применяют различные *ацилирующие реактивы*, например ангидриды уксусной или трифторуксусной кислоты, либо многочисленные силилирующие реактивы.

Детектирование обычно осуществляется с применением *ПИД, АФД* или *МС-детектора* в режиме ионизации электронным ударом при 70 эВ или *ИК-Фурье-детектора*. Последний вид оборудования хотя и достаточно редок, но по своим возможностям может значительно дополнить результаты масс-спектрометрического анализа или полностью заменить его.

В неизмененном виде барбитураты имеют МС, достаточно сложно поддающиеся идентификации. В связи с этим используют N-метильные или N,N-диметильные производные барбитуратов. На рис. 6-37 приведена одна из возможных общих схем основных путей фрагментации N,N-диметильных производных барбитуратов.

ВЭЖХ используют для исследования барбитуратов как выделенных из биологических объектов, так и содержащихся в вещественных доказательствах. Для этого чаще всего применяют обращеннофазовые колонки с сорбентами С8 или С18. В качестве подвижной фазы (в изократическом или градиентном режиме) используют смесь ацетонитрила **(**или метанола) с водным буфером или смеси растворителей, например ацетонитрила, изопропанола и гексана с фосфатным или ацетатным буфером.

Лучшим выбором для детектирования барбитуратов считают УФ-детектор или диодную матрицу. В последнее время широкое распространение получил метод ВЭЖХ-МС.

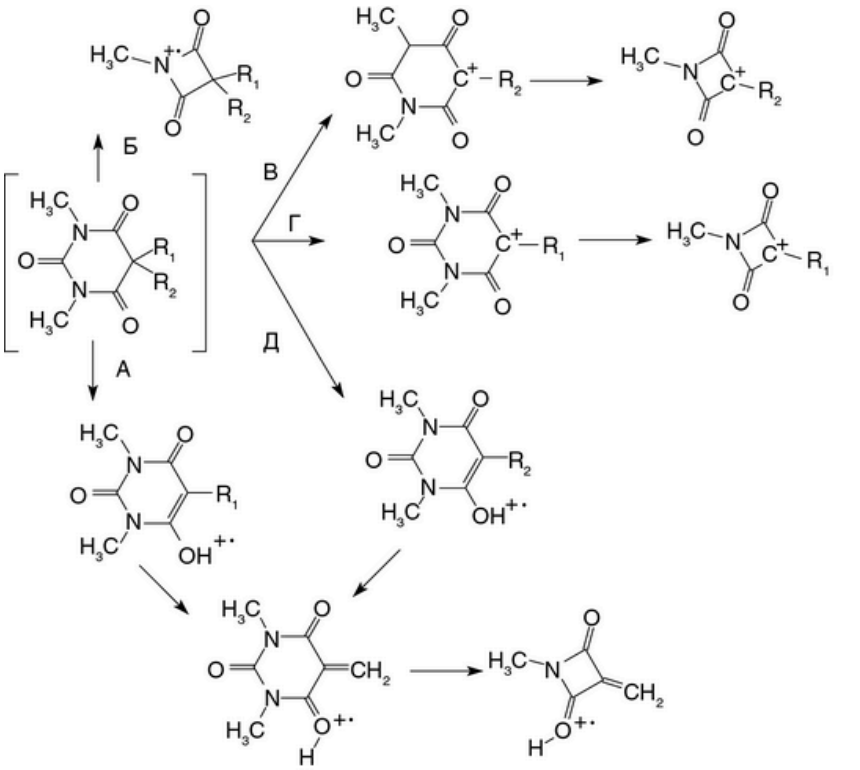


Рис. 6-37. Схема фрагментация N, N-диметильных производных барбитуратов (А, Б, В, Г, Д — пути фрагментации)

6.3.8. Производные 1,4-бензодиазепина

Когда сквозь иней на окне
Не видно света божья,
Безвыходность тоски вдвойне
С пустыней моря схожа.

Борис Леонидович Пастернак (1890–1960),
выдающийся русский
и советский поэт, писатель,
переводчик, один из крупнейших
русских поэтов XX века,
лауреат Нобелевской премии
по литературе (1958)

Наша жизнь стоит столько, во сколько
она нам обошлась при преодолении
возникавших в процессе ее трудностей.

Франсуа Мориак (1885–1970),
французский писатель,
лауреат Нобелевской премии
по литературе (1952)

Успокоительные средства, известные как транквилизаторы или анксиолитики, предназначаются для лечения психологических и физиологических симптомов беспокойного состояния. *Транквилизаторы* (лат. *tranquillium* — спокойствие) представляют собой одну из важнейших групп психотропных средств. В последнее время их все чаще называют *анксиолитиками* (лат. *anxius* — тревожный и греч. *lysis* — растворение). Есть и другие, менее распространенные названия: *атарактики* (греч. *ataraxia* — невозмутимость), психоседативные средства, антиневротические средства.

Значительное количество лекарственных препаратов разных групп способно проявлять противотревожные (собственно транквилизирующие) свойства. В частности, такие свойства присущи некоторым антидепрессантам —

препаратам, оказывающим в целом стимулирующее влияние на психические процессы (см. п. 6.3.9). В то же время такой классический транквилизатор, как дипазепам, обладает антидепрессивным эффектом. Эти перекрывающиеся спектры фармакологической активности казалось бы совершенно разных лекарственных препаратов свидетельствуют о полимодальности психотропных эффектов, исключительной сложности механизмов различных нарушений психики, происходящих с участием многих нейромедиаторов, и общности некоторых нейрохимических и нейрофизиологических звеньев этих нарушений.

Транквилизаторы известны около 60 лет. В настоящее время более 40 производных 1,4-бензодиазепина используется в клинической практике.

В феврале 1984 г. на 8-й специальной сессии Комиссия по наркотическим средствам ООН решила поставить под международный контроль 33 производных бензодиазепина. На территории Российской Федерации многие вещества из данной группы контролируются в соответствии с постановлением Правительства РФ от 30 июня 1998 г. № 681.

В основе структуры производных 1,4-бензодиазепина лежит 5-фенил-1,4-диазепин, конденсированный в положениях 6, 7 с бензольным циклом (рис. 6-38**)**.

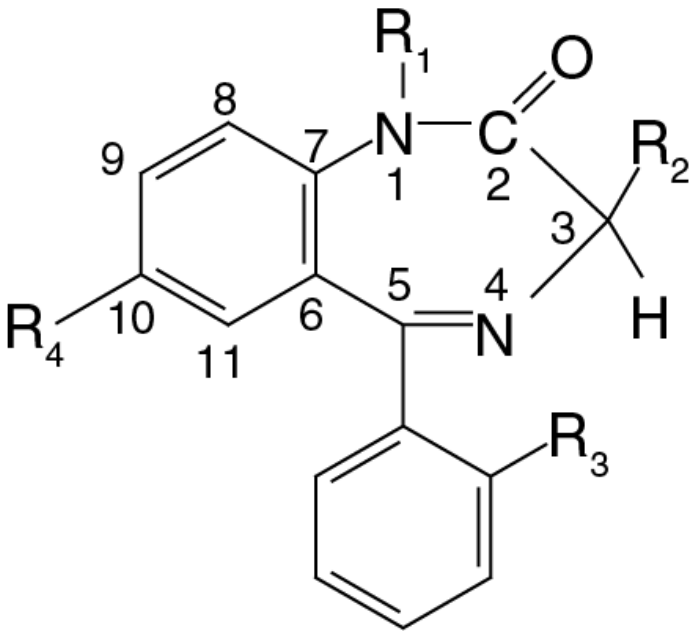


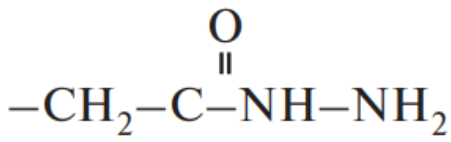
Рис. 6-38. Общая структурная формула производных 1,4-бензодиазепина

Синтезированы и применяются в медицинской практике производные 1,5-бензодиазепина, 2,3-бензодиазепина, имидазобензодиазепина, триазолобензодиазепина, а также другие гетероциклические производные бензо-1,4-диазепина.

В табл. 6-17 приведены структурные различия некоторых производных 1,4-бензодиазепина, наиболее часто употребляемых в РФ.

Таблица 6-17. Структурные различия некоторых производных 1,4-бензодиазепина

1,4-Бензодиазепин	**R**~1~	**R**~2~	**R**~3~	**R**~4~
Оксазепам (нозепам)	–H	–OH	–H	–Cl
Диазепам (сибазон)	–CH~3~	–H	–H	–Cl
Нитразепам	–H	–H	–H	–NO~2~
Феназепам	–H	–H	–Cl	–Br

Гидазепам		–H	–H	–Br
Медазепам (мезапам)*	–CH~3~	–H	–H	–Cl
Хлордиазепоксид (хлозепид)**	–H	–H	–H	–Cl

* Отсутствует карбонильная группа.

** Между N~1~ и C~2 ~— двойная связь (N~1~=C~2~); при C~2 ~стоит заместитель –NH (CH~3~); в положении 4: N → O.

Физико-химические свойства. Производные 1,4-бензодиазепинов — бесцветные кристаллические вещества, практически нерастворимые в воде. Их соли (по амино- или карбоксильной группе) растворимы в воде. Растворимость в органических растворителях зависит от химической природы вещества. Лучше всего они растворяются в апротонных растворителях. Липофильность (lg *K*~p~) производных бензодиазепинов находится в диапазоне 2,16–2,98. Структура веществ этой группы определяет характер поглощения в УФ-области. В УФ-спектрах имеются три полосы поглощения с λ~max~ в областях 200–215, 220–240 и 290–330 нм. Две первые полосы отвечают возбуждению ароматических хромофоров, а третью полосу связывают с колебательным возбуждением азометиновой группы.

Абсорбция производных 1,4-бензодиазепинов в УФ-области изменяется в зависимости от pH их растворов:

* в кислой среде — за счет протонирования атома азота в положении 1 или 4; * в щелочной среде возможно изменение хромофорной системы (увеличение сопряжения за счет лактим-лактамной таутомерии азометиновой связи в положении 1, 2).

Это свойство положено в основу идентификации соединений данной группы по электронным спектрам поглощения.

Производные 1,4-бензодиазепинов являются слабыми основаниями, склонными к гидролизу в кислой и щелочной средах, в результате которого образуются аминобензофеноны. В табл. 6-18 приведены названия некоторых бензодиазепинов и соответствующих им аминобензофенонов.

Таблица 6-18. Некоторые бензодиазепины и соответствующие им аминобензофеноны

Бензодиазепин	**Продукт гидролиза — аминобензофенон**	
	Название	**Сокращение**
Оксазепам	2-амино-5-хлорбензофенон	АХБ
Хлордиазепоксид	2-амино-5-хлорбензофенон	АХБ
Диазепам	2-метиламино-5-хлорбензофенон	МАХБ
Нитразепам	2-амино-5-нитробензофенон	АНБ
Феназепам	2-амино, 5-бром), 2′-хлорбензофенон	АБХБ
Медазепам	2-метиламино-5-хлорбензофенон	МАХБ

Фармакология и токсикология

По фармакологическому действию производные бензодиазепина относятся к транквилизаторам, снотворным, противосудорожным препаратам и центрально действующим мышечным релаксантам.

Механизм действия. В 1977 г. были открыты бензодиазепиновые рецепторы, которые расположены только в ГАМК-ергических синапсах (как на пре-, так и на постсинаптических мембранах). ГАМК (основной ингибитор нейротрансмиссии в ЦНС) действует, связываясь с ГАМК~A~-рецепторами — лигандзависимыми каналами, в которых участок связывания нейромедиатора и ионный канал составляют один макромолекулярный комплекс. Поскольку ионный канал, входящий в состав ГАМК~A~-рецептора, селективно пропускает внутрь нейрона анионы

хлора, активация ГАМК~А~-рецептора приводит к гиперполяризации нейрона и тормозит запуск потенциала нейропередачи. Механизм действия бензодиазепинов основан на связывании со специфическим участком ГАМК~А~-рецептора.

ГАМК~А~-рецептор служит основным местом действия не только бензодиазепинов, но и барбитуратов, а также обусловливает некоторые токсические эффекты этанола. *Бензодиазепины и барбитураты связываются с различными участками рецептора* и усиливают тормозящее действие ГАМК. Они действуют посредством аллостерическойАллостерические модуляторы — вещества, связывающиеся с участком рецептора, отличным от активного центра, и изменяющие выраженность эффекта агонистов или антагонистов. Аллостерические модуляторы могут быть позитивными или негативными, усиливающими или ослабляющими действие лигандов соответственно. регуляции, изменяя конфигурацию рецептора так, что его сродство к ГАМК увеличивается. Кроме того, эти препараты взаимно усиливают действие друг друга. Этиловый спирт также действует аллостерически, повышая сродство рецептора к ГАМК и другим препаратам. Он не связывается с самим рецептором, а изменяет его мембранное окружение. В высоких дозах барбитураты и этиловый спирт, *но не бензодиазепины* могут открывать каналы для ионов хлора независимо от ГАМК. Тот факт, что бензодиазепины, барбитураты и этиловый спирт действуют на один и тот же рецептор, объясняет их фармакологический синергизм (а значит, опасность передозировки при комбинированном применении) и перекрестную толерантность. Перекрестная толерантность используется при детоксикации больных алкоголизмом бензодиазепиновыми препаратами.

ГАМК~А~-рецепторы состоят из нескольких субъединиц. Активный ГАМК~А~-рецептор включает 2 α-субъединицы, 2 β-субъединицы и g- или δ-субъединицу. С бензодиазепинами взаимодействуют только те рецепторы, у которых имеется g-субъединица. Выявлено несколько разновидностей α-, β- и g-субъединиц. Разнообразие ГАМК~А~-рецепторов обеспечивается различными сочетаниями субъединиц, поэтому следует надеяться на разработку в будущем новых, более селективных бензодиазепиноподобных препаратов, обладающих менее выраженным седативным свойством или реже вызывающих зависимость.

Предполагают, что анксиолитические свойства бензодиазепинов связаны с ингибированием нейронов лимбической системы, а также серотонинергических (5-СН, или 5-НТ) и норадренергических нейронов ствола мозга. Противосудорожное действие бензодиазепины оказывают на нейроны коры. Терапевтический эффект производных бензодиазепина — результат одновременного воздействия препарата на множество структур головного мозга, чем, по-видимому, и определяется широкий спектр их фармакологической активности. Поэтому, кроме собственно анксиолитического, к основным фармакологическим эффектам транквилизаторов относятся седативный, миорелаксирующий, противосудорожный, снотворный, вегетостабилизирующий и амнестический.

Наряду с особенностями механизма действия, дозой и длительностью применения на эффект транквилизаторов существенно влияет фармакогенетический фактор — генетически обусловленный тип ответа организма на эмоционально-стрессовое воздействие.

Серьезные проблемы связаны с возможностью формирования при приеме производных бензодиазепина зависимости и синдрома отмены.

Для лечения передозировки производными бензодиазепина принимают внутрь или вводят внутривенно *специфический антагонист — флумазенил*.

Токсикокинетика и биотрансформация

Производные бензодиазепина *хорошо всасываются* после приема внутрь путем диффузии. При внутривенном введении этот процесс происходит значительно быстрее и сопровождается иными клиническими эффектами, чем при приеме внутрь. В частности, почти сразу после поступления диазепама в венозную кровь наблюдается выраженная седация. Эти эффекты нехарактерны для сопоставимых доз препарата при приеме внутрь.

Производные бензодиазепина в среднем на 80–95% связываются с белками плазмы, поэтому скорость абсорбции достаточно высокая, имеют большое сродство к тканям, богатым липидами, накапливаются в них. *Максимальный уровень в крови* при введении терапевтических доз *per os* достигается в среднем через 1–3 ч и сохраняется около 2 ч, затем медленно снижается. Препараты этой группы легко проникают через плаценту.

Накопление производных бензодиазепина происходит в первую очередь в паренхиматозных органах. Наибольшее их содержание в тканях печени и почек.

В табл. 6-19 приведены фармакокинетические параметры ряда производных бензодиазепина.

Таблица 6-19. Токсикокинетические параметры производных бензодиазепина (по R. C. Baselt)

Препарат	Время достижения *C*~макс ~в крови, ч	*V~d~*, л / кг	Связывание с белками	*T* ~½~, ч	p*K~a~*
Алпразолам	1–2	0,9–1,3	0,65–0,75	6–26	2,4
Хлордиазеп-оксид	0,5–4	0,3–0,5	0,94	6–27	4,8
Клоназепам	1–3,5	1,5–4,4	0,8	19–60	1,5; 10,5
Диазепам	0,5–1,5	0,7–2,6	0,96	21–37	3,4
Флуразепам	3–5	3,4–5,5	0,97	1–3*	1,9; 8,2
Лоразепам	2–5	0,9–1,3	0,8	9–16	1,3; 11,5
Мидазолам	0,2–0,8	1–4	0,96	1–4	6,2
Нитразепам	0,5–4	2–5	0,87	17–48	3,2; 10,8
Оксазепам	1–4	0,7–1,6	0,87–0,94	4–11	1,7; 11,6
Празепам	6	12–14	0,8–0,97	1,3	2,7
Темазепам	2–3	0,8–1	0,97	3–13	1,3
Триазолам	0,75–3	1,1–2,7	0,78	1,8–3,9	1,2; 1,5, 2,2; 6,5

* 47–100 ч для N-1-дезалкилфлуразепама.

Примеры реакций биотрансформации производных бензодиазепина представлены в табл. 6-20.

Таблица 6-20. Реакции биотрансформации производных бензодиазепина

Вещество	Основной метаболит	Тип реакции	Примечание
Диазепам	Дезметилдиазепам	N-деметилирование	Фармакологически активные метаболиты
	4-Гидроксидиазепам	Гидроксилирование	
Хлордиазе-поксид	Дезметилхлордиазепоксид	N-деметилирование	Фармакологически активные метаболиты
	Нордизепам	Окисление	
Флуразепам	N-1-дезалкилфлуразепам	Дезэтилирование	Фармакологически активный метаболит
Триазолам	4-Гидрокситриазолам и 1-гидрокиметил-4-гидрокситриазолам	Гидроксилирование	Фармакологически активные метаболиты
Мидазолам	1-Гидроксимидазолам	Гидроксилирование	Фармакологически активный метаболит
Нитразепам	2-Амино-5-нитробензофенон (АНБ)	Гидролиз	Разрыв азепинового кольца в положении 1, 2 и 4, 5
	7-Аминонитразепам	Восстановление нитрогруппы у С7	Фармакологически активный метаболит
Оксазепам	Глюкуронид оксазепама	Конъюгирование	С глюкуроновой кислотой по ОН-группе; фармакологически неактивный метаболит; образование глицина как второго продукта реакции
Алпразолам	α-Гидроксиалпразолам, 4-гидроксиалпразолам, α, 4- дигидроксиалпразолам	Гидроксилирование	Фармакологически активный метаболит

	3-Гидрокси-5-метилтриазолилхлор-бензофенон *(ГМТБФ)*	Гидролиз	Расщепление азометиновой связи и образование аналога хлорбензофенона
Лоразепам	Глюкуронид лоразепама	Конъюгирование	С глюкуроновой кислотой по ОН-группе; фармакологически неактивный метаболит
Триазолам	1-Гидроксиметил-триазолам (α-гидрокситриазолам)	Гидроксилирование	Фармакологически активный метаболит

Основные метаболиты производных 1,4-бензодиазепина, как правило, фармакологически активны. Разрыв при гидролизе азепинового кольца бензодиазепинов, а также образование глюкуронидов приводят к снижению и потере активности.

Выводятся производные 1,4-бензодиазепина в основном почками в виде основных соединений и их метаболитов. Наличие в органах активных метаболитов производных бензодиазепина снижает скорость элиминации.

Часть производных бензодиазепинов может перераспределяться в тканях после смерти, при этом соотношение концентраций в крови из сердца / бедра составляет 1,5–4 раза в зависимости от природы соединения, например алпразолам — в пределах 1,0–2,8; мидазолам — в пределах 3,0–5,0; триазолам — в среднем в 2,8 раза. Лоразепам, вероятно, не перераспределяется в организме после смерти, соотношение концентраций в крови из сердца / бедра составляет в среднем 1,0 (в пределах 0,8–1,1).

Продукты метаболизма, как и исходные соединения, обнаруживаются во многих тканях организма.

Методы определения

Способы пробоподготовки. Выбор биообъектов для исследования и предварительную пробоподготовку образцов проводят согласно цели исследования, обстоятельств дела и методологии ХТА (см. гл. 4).

В биологических объектах определение производных бензодиазепина желательно проводить незамедлительно после их изъятия. Если это невозможно, то объекты должны быть направлены на исследование в замороженном состоянии. Использование этанола в качестве консерванта не рекомендуется. В табл. 6-21 приведены способы экстракции, используемые для выделения производных бензодиазепинов из различных объектов.

Таблица 6-21. Способы экстракции, используемые для выделения производных бензодиазепинов

Объекты исследования	**Определяемые вещества**	**Способы пробоподготовки**	**Выход бензодиазепинов**
Лекарственные препараты	Определяемое соединение	Как правило, метанольные растворы с концентрацией 1–20 мг / мл	
Кровь	Нативное соединение у живого лица и трупа	ТФЭ*, боратный буфер pH 9,0, элюент — метанол	75–94% для диазепама, оксазепама, нордиазепама, мидазолама, флунитразепама, тетразепама, триазолама и др.
Моча	Нативное соединение и основные метаболиты у живого лица и трупа	Ферментативный гидролиз, ТФЭ*, фосфатный буфер, pH 6,0, элюент — этилацетат	85–94% для оксазепама, диазепама, нордиазепама, лоразепама, нитразепама, клоназепама, α-гидроксиалпразолама, α-гидрокситриазолама
		ТФЭ*, боратный буфер, pH 9,3, элюент — дихлорметан — изопропанол — аммиак	35–50% для оксазепама, лоразепама, клоназепама, триазолама, 75–90% для большинства других

		ЖЖЭ**, буфер, pH 9,0, экстрагент — *н*-бутилхлорид	50–98% для оксазепама, темазепама, лоразепама, клоназепама, триазолама, нитразепама, флунитразепама, их 7-аминометаболитов и др.
Печень	Нативное соединение и основные метаболиты у трупа	Возможны приведенные выше способы	50–100% при ЖЖЭ в зависимости от экстрагента, 85–95% при ТФЭ
Почки	Нативное соединение и основные метаболиты у трупа	Возможны приведенные выше способы	50–100% при ЖЖЭ в зависимости от экстрагента, 85–95% при ТФЭ
Фрагменты ЖКТ	Нативное соединение и основные метаболиты у трупа	Возможны приведенные выше способы	50–100% для флуразепама при ЖЖЭ в зависимости от экстрагента, 85–95% при ТФЭ

* Типы сорбентов для колонок, элюенты, методики выполнения ТФЭ приведены в гл. 4.

** Экстрагенты, условия проведения и особенности ЖЖЭ приведены в гл. 4.

Скрининговые методы определения производных бензодиазепина — иммунохимические тесты и ТСХ.

Условно выделяют два пути определения производных 1,4-бензодиазепина: первый путь — по продуктам гидролиза бенздиазепинов — 2-аминобензофенонам, второй путь — по содержанию в объектах исследования неизмененных (нативных) соединений совместно с метаболитами.

Способ определения производных 1,4-бензодиазепина по продуктам гидролиза — 2-аминобензофенонам позволяет суммарно определить нативные соединения и ряд метаболитов. Результатам придается отрицательное судебно-химическое значение. При положительном результате продолжают исследование по нативному соединению и метаболитам, что позволяет в ряде случаев с большей уверенностью сузить круг предполагаемых токсикантов.

Подтверждающие методы. К ним относятся УФ-ВИД-спектрофотомерия, ИК-Фурье-спектрометрия, ГХ и ВЭЖХ, а также гибридные методы: ГХ-МС или ГХ-ИК-Фурье-спектрометрия, ВЭЖХ-МС.

ГХ и ГХ-МС. ГХ можно рекомендовать в качестве метода, пригодного для анализа большинства бензодиазепинов, однако некоторые из них, в частности 3-гидроксизамещенные бензодиазепины, претерпевают термическую деструкцию и перегруппировку. Хлордиазепоксид, клоксазолам, лорметазепам, галоксазолам, оксазолам, этиллофлазепат и темазепам дают множественные пики. Кетазолам дает единичный пик, соответствующий диазепаму.

Система ГХ-МС дает *наиболее надежные результаты* определения производных бензодиазепина, продуктов их гидролиза и метаболитов для целей ХТА.

ВЭЖХ. Вследствие разнообразия химических структур бензодиазепинов методики разделения и определения этих соединений методом ВЭЖХ подбирают эмпирическим путем.

Для определения производных бензодиазепина *в биосредах* используют обращенно-фазовые колонки с сорбентами С8 или С18. Подвижная фаза — смеси фосфатного буфера и ацетонитрила и/ или метанола, применяемые в изократическом или градиентном режиме. При этом важно сохранение постоянного значения pH подвижной фазы. Для детектирования чаще всего применяют УФ-детектор или диодную матрицу (см. п. 5.3.3). Большинство производных бензодиазепина определяют при λ = 230 нм, нитропроизводные — при λ = 240 нм.

Система ТФЭ-ВЭЖХ-ДМД (диодно-матричный детектор) позволяет проводить экспресс-исследования, идентифицировать глюкурониды метаболитов производных бензодиазепина в моче. При этом повышается надежность результатов скрининга мочи, которая предварительно подвергается ферментативному гидролизу и процессу дериватизации полярных метаболитов. Метод применим для определения бензодиазепинов *в сыворотке крови, моче, гомогенатах тканей*.

ВЭЖХ-МС также широко используют для исследования бензодиазепинов в биообъектах.

ИК-Фурье-спектрометрия. Метод обладает достаточно высокой чувствительностью и позволяет идентифицировать индивидуальные вещества из группы бензодиазепинов.

Особенности интерпретации результатов определения производных бензодиазепина в крови и моче (табл. 6-22).

Таблица 6-22. Особенности интерпретации результатов определения производных бензодиазепина в крови и моче

Биообъект	Комментарии	
Моча	Нет прямой зависимости найденной концентрации от введенной дозы. Метаболиты в основном содержатся в виде глюкуронидов. Низкий процент экстракции аналита органическим растворителем	Бензодиазепины короткого действия обнаруживаются в течение 24–48 ч после приема, препараты среднего и длительного действия — 7–10 дней. Нитро- и триазолопроизводные имеют специфические метаболиты. В большинстве случаев основной метаболит — оксазепам
Кровь (сыворотка или плазма)	Индикаторы оценки уровня интоксикации. Низкие концентрации аналита в крови, поэтому для скрининга чаще используют мочу	Следует принимать во внимание наличие в крови алкоголя, наркотиков, других лекарственных средств. Следует учитывать, что концентрации аналита будут выше ожидаемых (при приеме терапевтических доз) у лиц с хроническими заболеваниями и людей пожилого возраста. При повышенной чувствительности к препаратам интоксикация может наступить при низких концентрациях аналита. Толерантность к бензодиазепинам обусловливает прием препаратов в значительно бóльших, чем терапевтические, дозах, что подтверждается результатами ХТА

6.3.9. Нейролептические средства

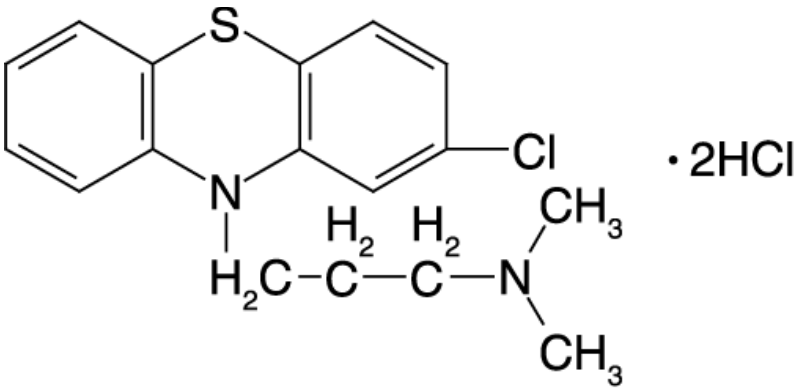
Ты можешь исцелить болящий разум,
Из памяти с корнями вырвать скорбь,
Стереть в мозгу начертанную смуту
И сладостным каким-нибудь дурманом
Очистить грудь от пагубного груза,
Давящего на сердце?

Уильям Шекспир (1564–1616), великий английский драматург, поэт и актер, один из лучших драматургов мира

Нейролептические средства (нейролептики) составляют одну из главных групп современных психотропных препаратов. Нейролептики принадлежат к веществам нескольких разных химических групп (табл. 6-23). Хлорпромазин является родоначальником группы фенотиазинов (1950 г.). Кроме того, существуют препараты смешанного типа, такие как сульпирид и клозапин.

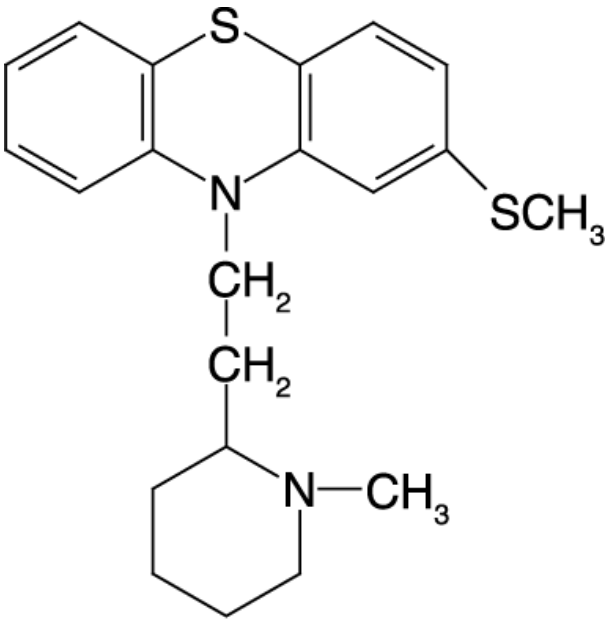
Таблица 6-23. Нейролептики различных химических групп

Группа веществ	Химическая структура
Фенотиазины аминопропилового ряда	Хлорпромазин (аминазин)



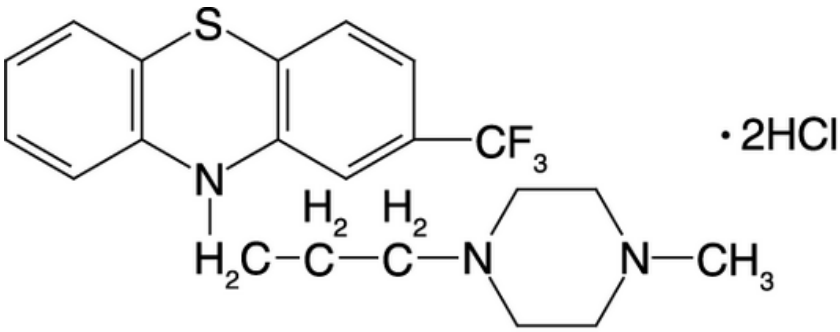
Тиоридазин (сонапакс)

Фенотиазины пиперидинового ряда



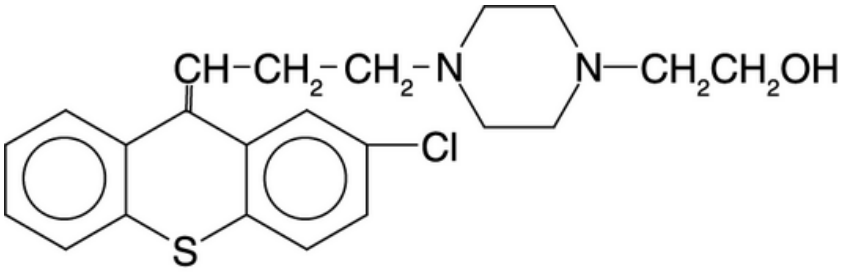
Трифтазин

Фенотиазины пиперазинового ряда



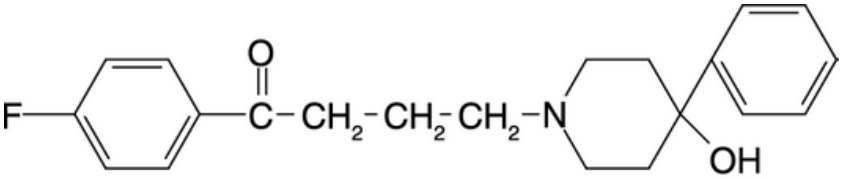
Зуклопентиксол

Тиоксантены

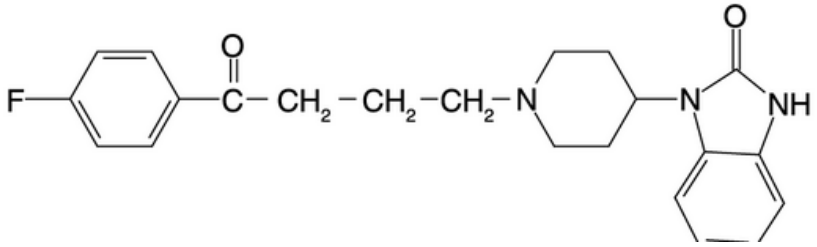


Бутирофеноны

Галоперидол

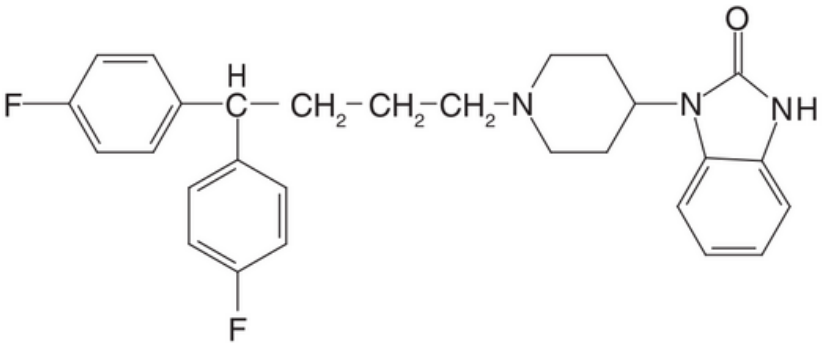


Дроперидол



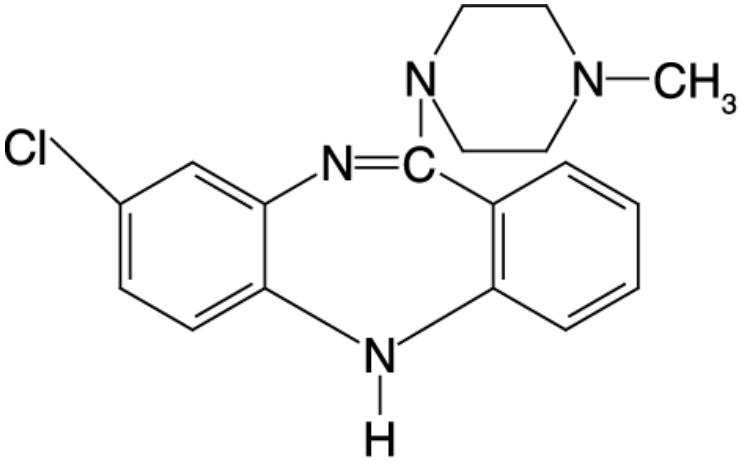
Пимозид

Дифенилбутил-пиперидины

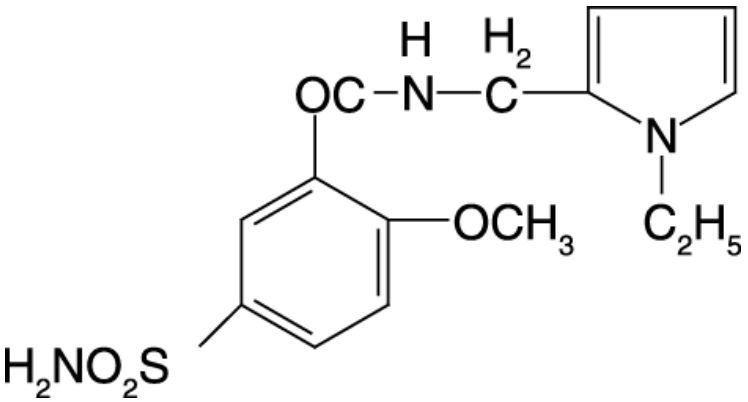


Клозапин

Атипичные



Сульпирид



Нейролептики *группы фенотиазина* (рис. 6-39) в положении N~10~ могут иметь различные заместители:

* аминопропильные; * пиперидиновые; * пиперазиновые.

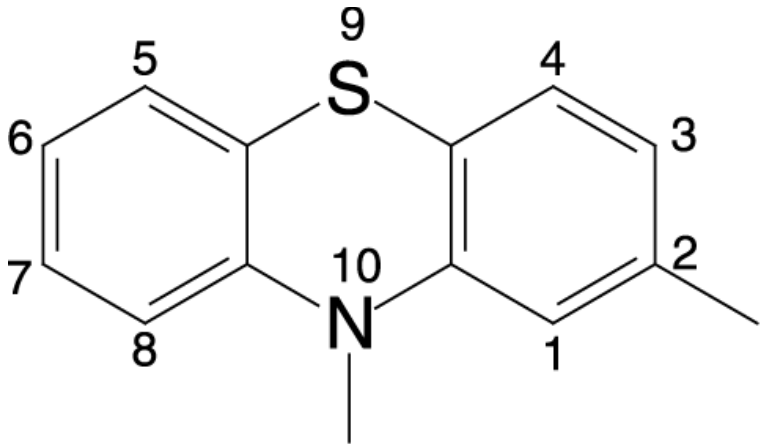


Рис. 6-39. Структурная формула нейролептиков группы фенотиазина

Фенотиазины пиперазинового ряда (трифтазин, фторфеназин) являются наиболее активными психотропными препаратами данной группы. Они обладают небольшой антихолинергической активностью, однако при их применении высока вероятность проявления симптомов лекарственного паркинсонизма.

Препараты *тиоксантенового ряда* имеют в своей структуре двойную связь и могут существовать в форме *цис*- и *транс*-изомеров. *Цис*-изомеры примерно в 20 раз активнее *транс*-форм, а некоторые препараты этой группы эффективны только в том случае, если преимущественно находятся в виде *цис*-изомера (например, зуклопентиксол).

Бутирофеноны и *дифенилбутилпиперидины* (галоперидол, трифлуперидол, меторин, дроперидол, флуспирилен, пимозид, пенфлюридол) сходны по химическому строению. Некоторые бутирофеноны рассматриваются как замещенные пиперидины, а азоперон и флуанизон — как производные пиперазина.

Сульпирид и клозапин выделили в отдельную группу *атипичных нейролептиков*, так как при их применении симптомы лекарственного паркинсонизма проявляются крайне редко.

Физико-химические свойства. Основный характер производных фенотиазина обусловлен наличием в структуре гетероцикла атома азота (p*K~a~* = 4) и третичного атома азота в алифатическом радикале (p*K~a~* = 9,1–9,8). При взаимодействии с кислотами фенотиазины образуют соли, легко растворимые в воде, спирте, хлороформе, но практически нерастворимые в эфире и бензоле.

Основания производных фенотиазина — липофильные вещества, нерастворимые в воде, но растворимые в спирте, эфире, хлороформе, этилацетате. Абсорбция производных фенотиазина в УФ-области спектра характеризуется наличием двух максимумов: при λ~max ~= 250–260 нм (ε — 35 000) и при λ~max~ = 300–315 нм (ε — 4500).

Сравнение УФ-спектров солей производных фенотиазина со спектрами их оснований показывает, что они практически идентичны. Следовательно, их УФ-спектры отражают только электронную структуру фенотиазиновой части молекулы (хлорпромазин, прометазин). Исключение представляют те производные, которые в положении 2 содержат радикалы со свободными *n*-электронами (тиоридазин, левомепромазин).

Сульфоксиды производных фенотиазинов, в отличие от исходных соединений, имеют четыре максимума в УФ-области: при λ~max ~= 230, 265, 285 и 400 нм.

Физико-химические свойства нейролептиков, относящихся к веществам других химических групп, имеют свои особенности.

Фармакология и токсикология

По современным представлениям, развитие психозов связано с нарушением обмена некоторых медиаторов нервной системы, в первую очередь дофамина, норадреналина и серотонина. Большинство существующих антипсихотических лекарств либо *блокируют рецепторы* этих медиаторов, либо *тормозят их высвобождение и обратный захват*. Антипсихотический эффект нейролептиков обусловлен блокированием центральных

дофаминовых рецепторов. Исследования показали, что дофаминовые рецепторы неоднородны. Лишь некоторые из них участвуют в формировании психотической симптоматики и, соответственно, в антипсихотическом действии нейролептиков. Воздействие же нейролептиков на другие группы дофаминовых рецепторов приводит к появлению экстрапирамидальных нарушений и других побочных эффектов, а их роль в формировании собственно терапевтического ответа крайне незначительна.

В развитии психопатологической симптоматики большое значение имеет и серотонинергическая система. Некоторые нейролептики блокируют, кроме дофаминовых рецепторов, также адренергические и серотониновые рецепторы. Одновременное блокирование дофаминовых и серотониновых рецепторов приводит к более быстрой и полной редукции психопатологических расстройств. Антипсихотический эффект, обусловленный в основном торможением дофаминовой передачи, дополняется успокаивающим действием, связанным с блокадой рецепторов норадреналина и серотонина. На этом фоне усиливается эффект и увеличивается продолжительность действия принимаемых совместно с нейролептиками лекарств, угнетающих ЦНС, — препаратов для наркоза, снотворных и др.

Торможение дофаминовой передачи является причиной *основного побочного эффекта нейролептиков* — паркинсонического синдрома, проявляющегося снижением общей двигательной активности, замедленностью движений, дрожанием, повышением мышечного тонуса. Паркинсонизм и болезнь Паркинсона возникают при снижении посреднической роли дофамина в головном мозге.

Многие нежелательные свойства нейролептиков связаны с угнетающим влиянием на рецепторы вегетативной нервной системы. Это и расширение сосудов, и снижение артериального давления, и подавление секреции желез, и понижение температуры тела.

Нейролептики второго поколения (атипичные нейролептики), например клозапин (лепонекс), при клинически полном нейролептическом спектре активности оказывают по сравнению с классическими нейролептиками избирательное нейрохимическое действие. Они селективно блокируют только дофаминовые *D*~2~- и *D*~3~-рецепторы определенных областей мозга (в частности, мезолимбической) и имеют некоторое сродство к серотониновым рецепторам, чем объясняются особенности их клинического действия, в частности малая выраженность побочных экстрапирамидальных эффектов.

Новейшие нейролептики (рисперидон, оланзапин) обладают практически *равным сродством к дофаминовым и серотониновым рецепторам.* По эффективности они сравнимы или даже превосходят классические нейролептики при значительно более высокой переносимости.

В случае передозировки или умышленного принятия нейролептиков в повышенном количестве возможны *серьезные отравления и летальный исход*.

Почти все препараты, применяемые как нейролептические средства, относятся к списку Б — сильнодействующие вещества.

Токсикокинетика и биотрансформация

Большинство нейролептиков характеризуется хорошим всасыванием в кровь из мест поступления при разных путях введения (перорально, внутримышечно). При поступлении в кровь нейролептики связываются с белками плазмы крови, преимущественно с альбуминами. Кажущийся объем распределения *V~d~* для большинства нейролептиков составляет более 20 л / кг, однако имеются и некоторые исключения. Так, *V~d~* для сульпирида составляет всего 2 л / кг.

Нейролептики проникают через гематоэнцефалический барьер. Они локализуются в тканях органов (мозг, печень, почки), однако накапливаются в мозге в значительно меньшем количестве, чем во внутренних органах.

T~½~ большинства нейролептиков равен 10–30 ч. Лекарственные препараты с наиболее сильно выраженными липофильными свойствами, такие как пимозид и пенфлюридол, имеют *T*~½~ 100–200 ч, в то время как сравнительно более гидрофильный сульпирид практически полностью выводится с мочой в неизмененном виде с *T*~½~ около 10 ч.

T~½~ фторфеназина после инъекции в виде энантата составляет 3,5 дня, а при введении в виде деканоата достигает 7–10 дней. Для сравнения: при пероральном или внутримышечном введении этих препаратов в неэтерефицированном виде *T*~½~ составляет 15–20 ч.

Токсикокинетические параметры некоторых производных фенотиазина приведены в табл. 6-24.

Таблица 6-24. Токсикокинетические параметры некоторых производных фенотиазина

Производное фенотиазина	p*K*~*a*~	*T* ~½~, ч	*V*~*d*~, л / кг	Выведение в неизмененном виде, %	Связывание с белками плазмы крови, %
Хлорпромазин	9,3	15–30	21	Менее 1	95–98
Левомепромазин	9,2	16–78	30	Менее 1	97–99
Дипразин	9,1	10–15	13	2–3	75–93
Тиоридазин	9,5	10–36	15–19	Менее 1	99
Трифлуоперазин	8,1	7–18	Нет данных	Менее 1	Нет данных
Промазин	9,4	20–31	16–19	Менее 1	95–98

Биотрансформация производных фенотиазина может осуществляться тремя путями:

* 1-й путь — трансформация в радикалах R~1 ~и R~2~ (N-O-S-деметилирование приводит к увеличению полярности соединений; окисление N~10~-боковой цепи); * 2-й путь — окисление атома серы в сульфоксид или сульфон; * 3-й путь — ароматическое гидроксилирование в положении 3 и 7 с последующим конъюгированием с глюкуроновой кислотой.

В результате изучения биотрансформации хлорпромазина (рис. 6-40) было установлено, что при объединении всех известных путей превращения образуется более 150 возможных метаболитов вещества.

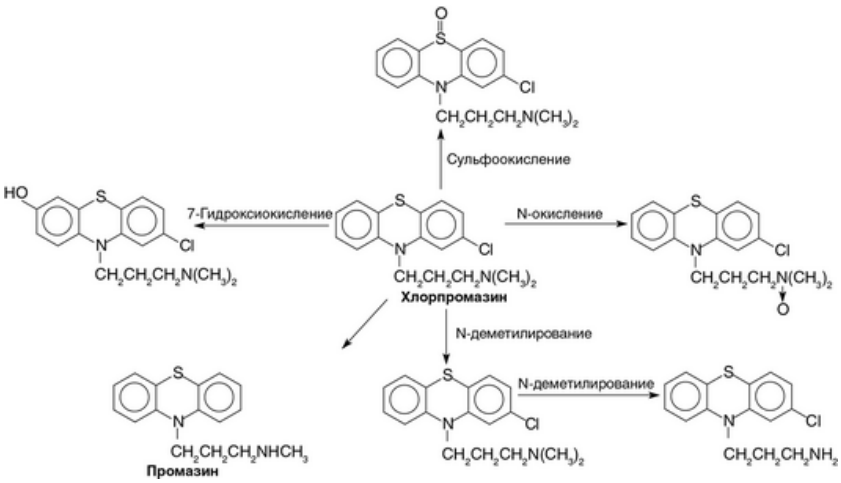


Рис. 6-40. Упрощенная схема биотрансформации хлорпромазина

В плазме крови образуется хлорпромазина сульфоксид. В результате деметилирования образуются моно- (нор1) — и дидезметил (нор) - метаболиты хлорпромазина, при окислении — хлорпромазин-N-оксид. Происходит ароматическое гидроксилирование в положении 7 и в меньшей степени в положении 3. Бóльшая часть фенольных метаболитов присутствует в форме конъюгатов, которые можно гидролизовать с помощью D-глюкуронилариль-сульфатазы. Деаминирование в радикале при N~10 ~дает 2-хлорфенотиазин-пропионовую кислоту, а при полной потере боковой цепи — 2-хлорфенотиазин.

Другие фенотиазины имеют сходные пути биотрансформации, однако препараты с более сложными заместителями образуют и большее количество метаболитов. Например, 2-тиометильная группа в тиоридазине окисляется в сульфоксид (мезоридазин) и сульфон (сульфоридазин), которые также обладают нейролептической активностью (рис. 6-41).

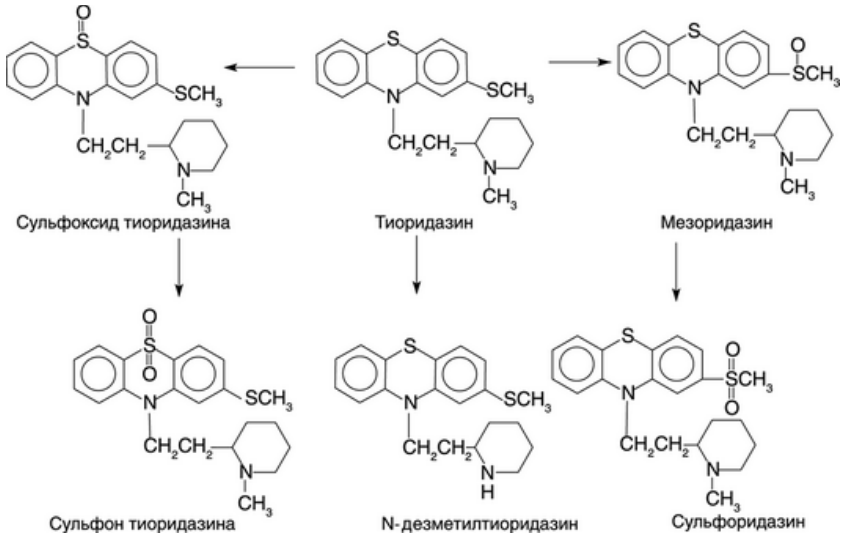


Рис. 6-41. Упрощенная схема биотрансформации тиоридазина

Биотрансформация фенотиазинов с боковой пиперазиновой цепью имеет еще более сложный характер. В пиперазиновой цепи происходит раскрытие кольца, при этом получаются этилендиаминовые производные, первичные аминосоединения, идентичные с теми, которые образуются при повторном деметилировании (дидеметилировании) диметиламино-замещенных исходных веществ.

Биотрансформация бутирофенонов. Галоперидол в организме подвергается биотрансформации примерно на 40% (рис. 6-42).

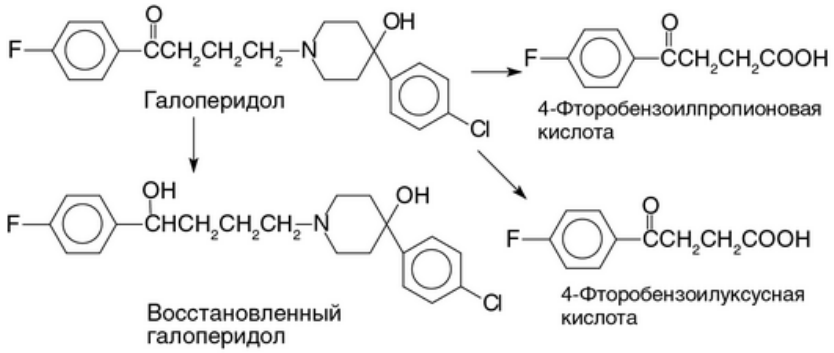


Рис. 6-42. Упрощенная схема биотрансформации галоперидола

Галоперидол всасывается в основном в тонком кишечнике, в неионизированной форме, путем пассивной диффузии. Максимальная концентрация в плазме крови достигается через 2–6 ч. Биодоступность препарата составляет 60–70%. Около 90% галоперидола связывается с белками плазмы крови, 10% представляют собой свободную фракцию. *Отношение концентрации в эритроцитах к концентрации в плазме крови* составляет 1:12. *Концентрация* галоперидола *в тканях выше, чем в крови;* отмечена тенденция препарата *к кумуляции в тканях*. Биотрансформация происходит в печени. Окислительное дезалкилирование дает 1-(4-фторобензоил)-пропионовую кислоту и ее конъюгат с глицином, а также 4-фторобензоилуксусную кислоту, ее конъюгат с глицином и 4-фторофенилацетуровую кислоту, которые являются фармакологически неактивными соединениями. Вероятно, галоперидол может быть конъюгирован с глюкуроновой кислотой и/ или сульфат-ионами без предварительных метаболических изменений. При восстановлении галоперидола образуется вторичный спирт, часто называемый восстановленным галоперидолом (RHAL). Это соединение обладает фармакологической активностью (около 25% активности исходного вещества) и может окисляться снова в галоперидол. Галоперидол экскретируется с мочой (40%) и калом (60%). *T*~½ ~после перорального применения составляет 12–37 ч. Проникает через гематоэнцефалический барьер и плаценту.

Другие бутирофеноны, например бромперидол, имеют сходные пути метаболизма.

Биотрансформация дифенилбутилпиперидинов. Пимозид может вступать в некоторые реакции окислительного N-дезалкилирования с образованием бензимидазолин-2-она, 1-(4-пиперидил)-бензимидазолин-2-она, 4-ди (4-фторофенил)-масляной кислоты, окисление которой дает 2-ди (4-фторофенил)-уксусную кислоту.

Биотрансформация атипичных нейролептиков. При окислении сульпирида в положении 2 пирролидинового кольца образуется пирролидинон. Метаболитами клозапина являются фармакологически активный N-дезметилклозапин и N-оксид клозапина.

В результате биотрансформации нейролептиков могут образовываться *соединения с хиральным атомом* углерода, например при восстановлении карбонильной группы пропиомазина и галоперидола. Конфигурация восстановленного галоперидола может оказывать влияние на его фармакологическую активность. *Энантиомеры* обычно присутствуют в приблизительно равных количествах, выделение и *количественное* определение одного из них может привести *к недооценке реального количества* токсичного вещества.

Выделяются нейролептики в значительных количествах с мочой и частично с калом. В моче обнаруживается в основном в виде метаболитов.

Концентрация нейролептиков в плазме крови во время терапии и при передозировке. Эффективность лечения хлорпромазином может быть достигнута при концентрации препарата в плазме более 30 мкг / л. Токсические эффекты наблюдаются при концентрации более 500 мкг / л, а летальной считается концентрация более 2000 мкг / л.

Многие фенотиазины эффективны при концентрации значительно ниже, чем для хлорпромазина. Так, фторфеназин (деканоиновый эфир) оказывает терапевтическое действие при концентрации его в плазме крови от 0,2 мкг / л. В двух смертельных случаях концентрация фторфеназина в печени составила 5 и 23 мг / кг. Для перфеназина терапевтическая концентрация несколько выше — 1,2–2,4 мкг / л, для трифторпиразина — 4,2–5,3 мкг / л через 6 ч после приема. Определение терапевтической концентрации тиоридазина осложнено высокой концентрацией активных метаболитов: при стабильных условиях концентрация мезоридазина сравнима с концентрацией основного соединения. Для обеспечения терапевтической эффективности предположительно требуется концентрация более 100 мкг / л. В восьми смертельных случаях отравления концентрация тиоридазина в крови погибших варьировала от 300 до 8500 мкг / л; аналогичная концентрация была отмечена для мезоридазина.

После приема терапевтической дозы концентрация тиотиксена в плазме крови составляет 10–22,2 мкг / л. Пример. Максимальная концентрация 520 мкг / л была определена у погибшего пациента, который принял 800 мг препарата. При смертельном отравлении, обусловленном приемом хлорпротиксена, концентрация в плазме крови основного препарата и сульфоксидного метаболита была равна 100 и 600 мкг / л соответственно.

Методы определения

Пробоподготовка. Для выделения нейролептиков из биологических материалов используют ЖЖЭ, ТФЭ и ферментативный гидролиз.

Хромогенные реакции. Многие нейролептики при окислении образуют характерные окрашенные соединения в присутствии серной кислоты. С 50% серной кислотой тиоридазин образует бирюзовое окрашивание, сульфоридазин и фторфеназин – розово-оранжевое окрашивание, мезоридазин, хлорпромазин, 9-ОН-хлорпромазин, 7-ОН-фторфеназин – розовое окрашивание, 7-ОН-хлорпромазин – бледно-лиловое окрашивание, 3-ОН-хлорпромазин – темно-синее окрашивание, 6-ОН-хлорпромазин – красно-розовое окрашивание, 8-ОН-хлорпромазин – синее окрашивание, 3,7-дигидрокси-хлорпромазин – окрашивание цвета морской волны.

ТСХ и ИХМ. Разработаны методики определения радиоиммунным методом соединений фенотиазинов и их метаболитов, среди которых галоперидол, хлорпромазин, фторфеназин, перфеназин, трифторперазин, прохлорперазин, тиоридазин. Предел определения при использовании 1 мл плазмы составляет 20 нг/л.

Для обнаружения производных фенотиазина и их метаболитов в ТСХ-скрининге используют реактивы-окислители:

* FPN-реактив образует пятна с окраской от розовой до сине-фиолетовой; * 57% раствор хлорной кислоты, содержащей три процента 0,5% раствора нитрита натрия – пятна с окраской от розовой до зелено-голубой; * подкисленный йодплатинат дает окраску пятен от желтой до серо-зеленой; * спиртовой раствор концентрированной серной кислоты (9:1) дает пятна различной окраски.

Для подтверждающего и количественного определения нейролептиков применяют ТСХ (иногда), методы ГХ, ГХ-МС, ВЭЖХ.

ГХ. Используют ПИД (ограниченно); ЭЗД (чувствительность метода 10 мкг / л); АФД (чувствительность метода 1–2 мкг / л), часто требуется проведение дериватизации**.**

ГХ-МС. Используют капиллярные колонки, заполненные плавленым кварцем, проводят дериватизацию. В режиме SIM детектируют низкие уровни метаболитов, чувствительность — 1 и 5 мкг / л для неизмененного вещества и метаболита соответственно.

ВЭЖХ — самый распространенный способ определения нейролептиков в настоящее время. Разработано много методик для широкого круга препаратов. Часто проводят УФ-детектирование, а также электрохимическое детектирование с серебряным электродом сравнения, используют флуориметрию для количественного определения.

Особенности исследования, влияющие на результаты определения нейролептиков. При проведении определения незначительных количеств нейролептиков могут наблюдаться:

* адсорбция вещества на стенках стеклянной посуды; * реверсия метаболитов; * влияние растворителей; * влияние пластификаторов.

Адсорбция вещества. Нейролептики, являющиеся липофильными веществами, могут быть потеряны в результате их адсорбции на стекле или пластике. Силилирование стеклянной посуды снижает адсорбцию, но в то же время способствует образованию эмульсий (с плазмой), что затрудняет определение. Следует иметь в виду, что адсорбированные стеклом фенотиазины могут сохраняться на нем после обычного мытья лабораторной посуды и загрязнять последующие образцы, давая *ложноположительные результаты.*

Реверсия метаболитов. Точность повторных определений, например хлорпромазина, в биообразцах хуже, чем в стандартных растворах. Определение фенотиазинов в хранящихся исходных образцах дает бóльшие концентрации вещества, чем изначальные исследования, что объясняется реверсией метаболитов к нативным соединениям. Возможна реверсия сульфоксидов и N-оксидов. Хлорпромазин, хлорпромазина сульфоксид и хлорпромазина-N-оксид стабильны в плазме человека до 7 дней при 40 °С и до 9 нед при 18 °С. Восстановление N-оксида до хлорпромазина на 2-й неделе объясняется его неустойчивостью в щелочных растворах. Метаболиты могут быть нестабильны при хроматографировании или дериватизации. N-оксиды восстанавливаются до нативных соединений на ГЖХ-колонке. Прометазина сульфоксид восстанавливается на ГХ-колонке. Фенотиазина сульфоксид может восстанавливаться дериватизирующим агентом, например трифтороацетангидридом.

Влияние растворителей. Вещества и их метаболиты могут реагировать с примесями в растворителях. Растворители иногда содержат различные добавки в качестве стабилизаторов. Например, хлороформ часто содержит этанол, дихлорметан может содержать этанол или пентен, а диэтиловый эфир — антиоксиданты для предотвращения превращения в пероксид (пирогаллол, гидрохинон, бутилгидрокситолуол), которые мешают электрохимическому детектированию. Накапливающиеся в эфире пероксиды могут окислять аналит, поэтому эфир необходимо очистить перед применением.

Влияние пластификаторов. Часто ложный пик или набор ложных пиков, возникающих на хроматограмме, можно приписать влиянию пластификаторов, попадающих в пробу на тех этапах, когда она контактирует с каким-либо пластиковым материалом. Например, при определении хлорпромазина методом ГХ-ЭЗД наблюдали пики пластификаторов, входивших в состав материала крышек экстракционных пробирок.

6.3.10. γ-Гидроксибутират натрия

Яд, который не действует сразу,
не становится менее опасным.

Готхольд Эфраим Лессинг (1729–1781),
немецкий поэт, драматург и просветитель

γ-Гидроксимасляная кислота (4-гидроксибутановая кислота, ГОМК) содержится в организме млекопитающих (рис. 6-43). По своим свойствам она близка к ГАМК, которая выполняет функции нейромедиатора, участвуя в процессах центрального торможения, обусловливая процессы бодрствования и сна. Под влиянием ГОМК активируются энергетические процессы мозга, повышаются кровоснабжение и дыхательная активность тканей, улучшается утилизация мозгом глюкозы.

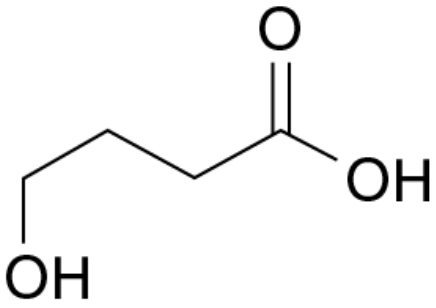


Рис. 6-43. Структурная формула γ-гидроксимасляной кислоты

В последнее десятилетие отмечается значительный рост случаев немедицинского злоупотребления различными препаратами на основе γ-гидроксимасляной кислоты.

Одновременно с ростом раскрытых преступлений, связанных с незаконным производством и распространением препаратов оксимасляной кислоты, отмечается резкое увеличение случаев отравлений ими. В незаконном обороте эти средства распространяются под названиями: GHB, G, Easy Lay, Nature’s Quaalude, «чашка (ложка)», «жидкий X», «жидкий экстази».

γ-*Гидроксибутират* (оксибутират натрия, другие названия — «оксик», натриевая соль γ-гидроксимасляной кислоты, натрия оксибат) — психотропное вещество. Первое упоминание о химическом синтезе оксибутирата натрия относится к 1874 г. Гидроксибутират применяют в жидкой форме, хотя иногда препарат встречается в виде порошка. Он хорошо растворим в воде, поэтому при злоупотреблении его добавляют в питьевую воду или маскируют в бутылях со средствами для полоскания рта.

Физические свойства

γ-Гидроксибутират натрия (рис. 6-44) — белый или белый с желтоватым оттенком кристаллический порошок со слабым специфическим запахом. Легко растворим в воде и спирте. Гигроскопичен. Водные растворы имеют pH от 7,9 до 8,9. При воздействии температуры или в кислой среде водных растворов γ-гидроксибутират циклизуется в γ-бутиролактон. γ-Бутиролактон тоже хорошо растворяется в воде, поэтому его иногда добавляют к алкогольным напиткам, которые усиливают его эффекты. Этим свойством часто пользуются преступники при совершении сексуального насилия, так как жертва не способна оказывать сопротивление и у нее могут возникнуть проблемы с памятью, что затрудняет дальнейшее судебное разбирательство.

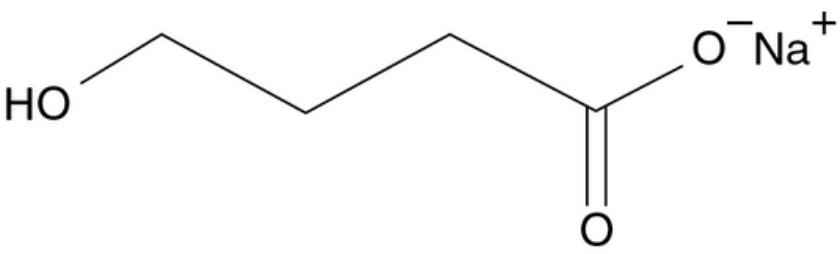


Рис. 6-44. Структурная формула оксибутирата натрия

В настоящее время оксибутират натрия применяется в качестве фармацевтического препарата, как средство для неингаляционного наркоза. Применяется в акушерско-гинекологической, офтальмологической, психологической и неврологической практике. Также существуют и другие соли γ-гидроксимасляной кислоты, например, γ-гидроксибутират лития. Он используется в медицине для лечения психопатических неврозов, профилактики гипоманиакальных и маниакальных состояний.

γ-Гидроксибутират присутствует в относительно высоких концентрациях в биологических жидкостях, мускулатуре, сердце и почках живых лиц, легко проникая через гематоэнцефалический барьер, в отличие от ГАМК и проявляет выраженное антигипоксическое действие (т.е. повышает устойчивость организма, в том числе тканей мозга, сердца, а также сетчатки глаза, к кислородной недостаточности), оказывает седативное и центральное миорелаксантное, противошоковое действие, в больших дозах вызывает сон и состояние наркоза.

Прием γ-гидроксибутирата вызывает эйфорию, усиливает половое влечение. Эффекты, вызываемые γ-гидроксибутиратом при употреблении в различных дозах, представлены в табл. 6-25.

Таблица 6-25. Разовые пероральные дозы γ-оксибутирата и его воздействие на человека

Доза, г	Воздействие на человека	Фармакологические проявления
0,5–1,5	Слабое	Эффекты подобны действию этанола. Появляется чувство слабой, мягкой релаксации, возрастает коммуникабельность, уменьшается двигательная активность, возникают легкое головокружение и другие проявления легкой алкогольной интоксикации. Притупляется внимание. Управление автомобилем или другой сложной техникой опасно для окружающих и для принявшего препарат человека
1,0–2,5	Среднее	Увеличивается седативное действие, усиливается дезориентация в окружающей обстановке. Обостряется восприятие музыки и движения танца, поднимается настроение. Усиливается половое влечение. Тошнота, рвота
2,0–3,5	Сильное	Практически полная дезориентация в окружающей обстановке. Состояние человека описывается как «совершенно больной, нездоровый»
1,0–5,0	Глубокий сон	
Более 5,0	Беспробудный сон в течение нескольких часов, кома, конвульсии, рвота	
10,0–14,0	Летальный исход	

Токсикокинетика и биотрансформция

γ-Гидроксибутират быстро абсорбируется и превращается в печени в бутиролактон (рис. 6-45).

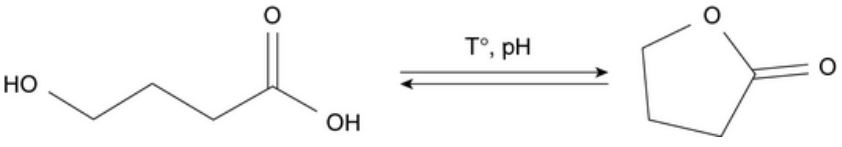


Рис. 6-45. Образование бутиролактона

Выводится с мочой в течение 8 ч. Только незначительное количество (менее 5%) вещества в неизмененном виде выводится с мочой. Спустя 12 ч в моче не детектируется. На рис. 6-46 представлена схема биотрансформации оксибутирата.

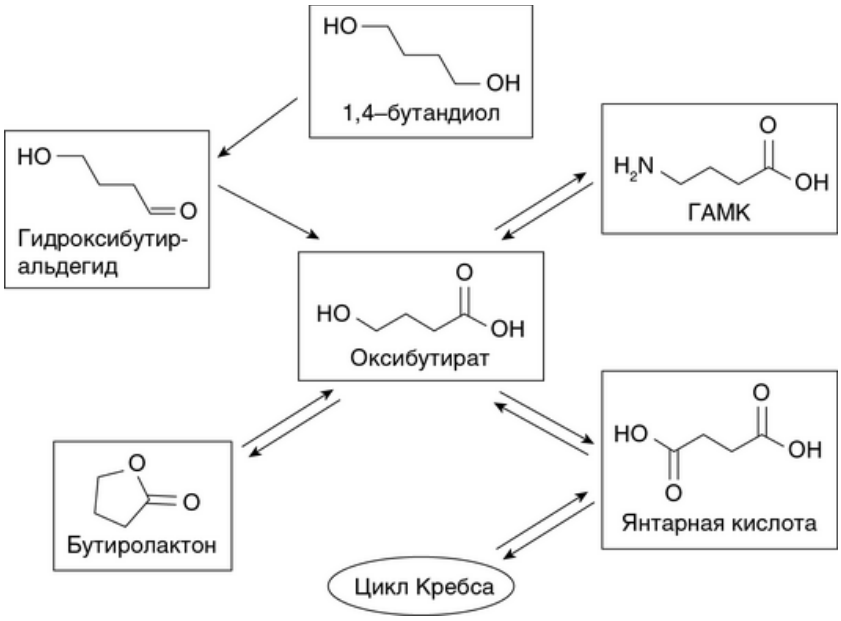


Рис. 6-46. Схема биотрансформации оксибутирата

γ-Бутиролактон (*GBL*) имеет широкое промышленное использование и является прекурсором синтеза γ-гидроксибутирата.

γ-*Бутиролактон* некоторые любители вечеринок принимают вместе с алкоголем. Усиление эффектов алкоголя при приеме γ-бутиролактона может привести к респираторным нарушениям, помрачению сознания, коме и даже смерти.

Методы определения

γ-Гидроксибутират определяется в биологических жидкостях методами ГХ, ВЭЖХ-МС, КЭ-МС и ГХ-МС.

При исследовании солей γ-гидроксимасляной кислоты методом ГХ-МС вначале получают с помощью модифицирующего агента — BSTFA их силильные производные (рис. 6-47).

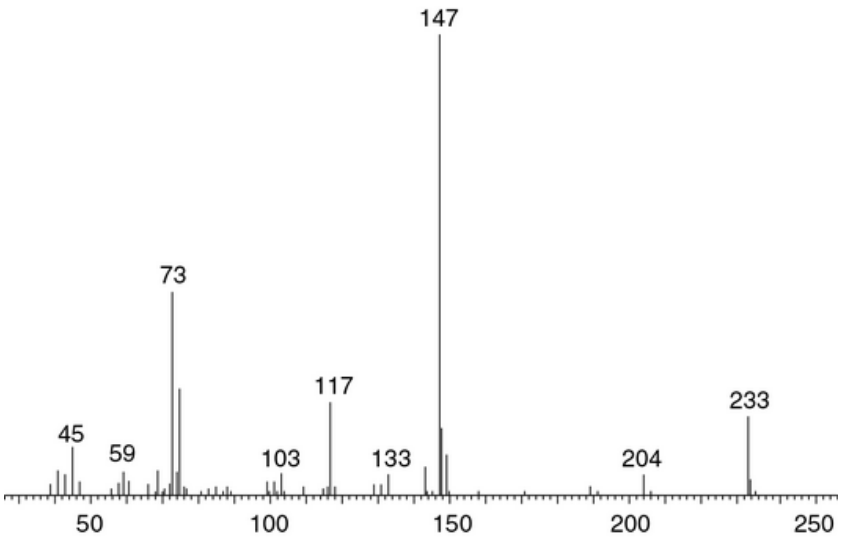


Рис. 6-47. Масс-спектр силильного производного γ-гидроксимасляной кислоты

При отсутствии BSTFA для косвенного подтверждения наличия в исследуемом веществе солей гидроксимасляной кислоты может быть использован метод получения γ-бутиролактона, который образуется в сильнокислой среде в результате циклизации γ-гидроксимасляной кислоты. Для этого к 1 мл исследуемого раствора соли γ-гидроксимасляной кислоты добавляют водный раствор соляной кислоты, до pH 3. Затем к полученному раствору добавляют 1 мл хлороформа, смесь перемешивают, отбирают хлороформный слой и исследуют его методом хромато-масс-спектрометрии. МС γ-бутиролактона приведен на рис. 6-48.

Известны случаи употребления оксибутирата натрия с различными напитками: кока-колой, кофе и др.

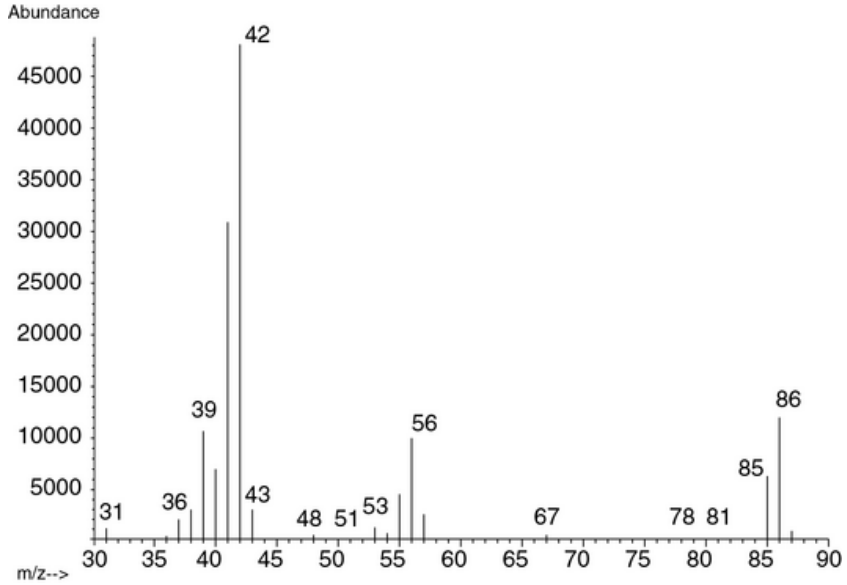


Рис. 6-48. Масс-спектр γ-бутиролактона

6.3.11. Спайсы — синтетические каннабимиметики

Ты думаешь, стоит захотеть, и ты бросишь, но это как сон.
А сон нельзя остановить. Он продолжается вопреки твоей воле.
И вдруг ты понимаешь, что ты бессилен.

«Дневники баскетболиста» — автор Джим Кэрролл (1949–2009),
американский писатель, поэт и панк-музыкант

Наркомания – многолетнее наслаждение смертью.

Франсуа Мориак (1885–1970),
французский писатель, лауреат
Нобелевской премии по литературе (1952)

Появление на рынке в России курительных смесей (спайсов), содержащих синтетические каннабиноиды (или синтетические каннабимиметики), ознаменовало новую эру ранее неизвестных наркотических средств. Ввозимые из-за границы под видом солей для ванн, ароматизирующих порошков или БАДов, их реализовали в основном через интернет-магазины. В Европе в 2010 г. было обнаружено 41 новое соединение, в 2011 г. — 49 соединений, в 2012 г. — 74 соединения, в 2013 г. — 81 соединение. По данным ООН, в период с 2009 по 2013 г. обнаружено 284 новых соединения с наркотической активностью. В России наиболее широкое распространение спайсы получили в 2009 г. и позиционировались как легальные смеси для курения, потому что не входили ни в один из списков Перечня. Синтез и поиск новых наркотических веществ из группы каннабиноидов все еще ведется весьма активно. Одной из целей роста числа подобных соединений — уход из-под контроля соответствующих органов. После принятия постановления Правительства РФ № 1186 от 31 декабря 2009 г., согласно которому вещество JWH-018 (см. ниже), а также еще 25 синтетических каннабимиметиков серий CP, HU, JWH было включено в список I Перечня, оборот спайсов на территории РФ резко снизился. Постановление Правительства РФ от 30 октября 2010 г. № 882 имело ряд дополнений, касающихся ***производных*** веществ, внесенных в списки постановлением Правительства РФ № 1186. Согласно постановлению Правительства Российской Федерации от 19 ноября 2012 г. № 1178 «***производные наркотических средств и психотропных веществ*** являются веществами синтетического или естественного происхождения, которые не включены самостоятельными позициями в государственный реестр лекарственных средств или в настоящий перечень, химическая структура которых образована заменой (формальным замещением) одного или нескольких атомов водорода, галогенов и (или) гидроксильных групп в химической структуре соответствующего наркотического средства или психотропного вещества на иные одновалентные и (или) двухвалентные атомы или заместители (за исключением гидроксильной и карбоксильной групп), суммарное количество атомов углерода в которых не должно превышать количество атомов углерода в исходной химической структуре соответствующего наркотического средства или психотропного вещества».

Введение юридической нормы позволило поставить под законодательный контроль сразу множество близких между собой, но не входящих отдельными позициями в Перечень веществ. В России по мере усиления мер законодательного контроля употребление спайсов среди наркоманов, которое было массовым явлением в 2009–2013 гг., стало заметно снижаться.

Спайсы — это так называемые аромасмеси, содержащие синтетические каннабиноиды, или синтетические каннабимиметики, которые в организме человека воздействуют на каннабиноидные рецепторы и воспроизводят физиологические реакции, близкие природным каннабиноидам. Для синтетических, как и природных, каннабиноидов характерно стимулирующее и седативное воздействие, а при более высоких дозах — галлюциногенные эффекты. Однако при потреблении синтетических каннабиноидов существенно преобладает галлюциногенное действие, которое наступает сразу после выкуривания смеси. По силе действия некоторые синтетические каннабиноиды превосходят тетрагидроканнабинол в несколько раз, иногда в десятки раз.

Спайсы представляют собой каннабимиметики, которые нанесены на сухую растительную подложку. В качестве растительного материала (подложки) чаще всего используют лекарственное растительное сырье, реализуемое через аптечную сеть. При этом выбирается такое сырье, которое само по себе в момент курения не вызывает нежелательных и непредсказуемых фармакологических эффектов, например листья мать-и-мачехи (*Folia Farfarae*), цветки ромашки аптечной *(Flores Chamomillae*), трава эрвы шерстистой (*Herba Aervae*), а также кукурузные рыльца со столбиками (Styli cum stigmatis Zeae Maydis). Спайсы — это готовые к употреблению, часто расфасованные в пакетики наркотические средства. Количество наркотика может варьировать от десятков до сотен миллиграммов на 1 г смеси. Кроме пакетиков, распространены и «аромасмеси» в виде спрессованных комков, внешне напоминающих гашиш. Чаще всего спайсы используют потребители марихуаны и гашиша.

Основной синтетической составляющей впервые появившихся на рынке спайсов было вещество с аббревиатурой JWH-018 (нафталин-1-ил)(1-пентил-1Н-индол-3-ил)метанон, относящееся к группе нафтоилиндолов. JWH — это аббревиатура инициалов его создателя Джона Хаффмана (англ. John W. Huffman). Несмотря на постоянное обновление и расширение списков Перечня на рынке появляются новые группы синтетических наркотических средств, оборот которых значительно больше по сравнению с включенными в списки веществами, в отношении которых применяются меры контроля.

К таким группам относится, например, группа фенилацетилиндолов, представителями которой являются вещества JWH-201 [3-(4-метоксибензоил)-1-пентилиндол] и JWH-250 [3-(2-метоксифенилацетил)-1-пентилиндол], а также группа нафтоилпирролы JWH-307 [5-(2-фторфенил)- 1-пентилпиррол-3-ил]-нафтален-1-илметанон.

В настоящее время выделен ряд основных групп синтетических каннабиноидов:

* дибензопираны (HU-210 и др.); * бензоилиндолы (RCS-4 и др.); * нафтоилиндолы (JWH-018 и др.); * нафтоилпирролы (JWH-307 и др.); * фенилацетилиндолы (JWH-250, JWH-203 и др.); * циклогексилфенолы (CP 47,497 и др.); * нафтилметилиндолы (JWH-175 и др.); * циклоалканкарбонилиндолы (адамантанкарбонилиндол AD-018 и др.); * циклоалканкарбонилиндолы (циклопропанкарбонилиндол TMCP-018).

Ниже приведены формулы некоторых представителей групп синтетических каннабиноидов (рис. 6-49–6-51).

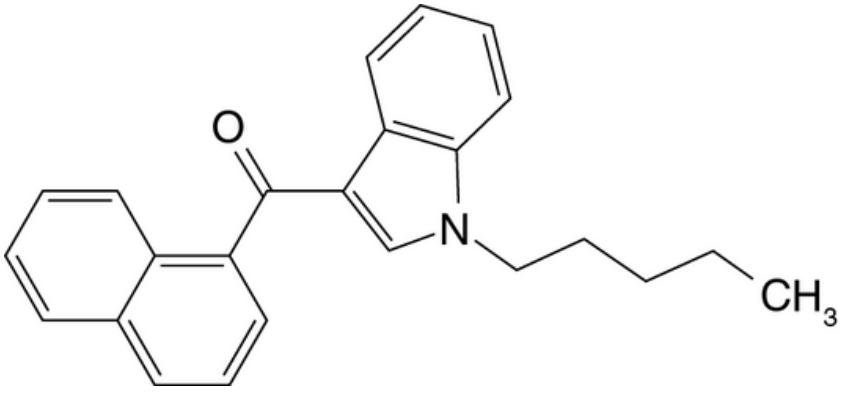


Рис. 6-49. Структурная формула вещества JWH-018 (нафталин-1-ил)(1-пентил-1Н-индол-3-ил)метанон

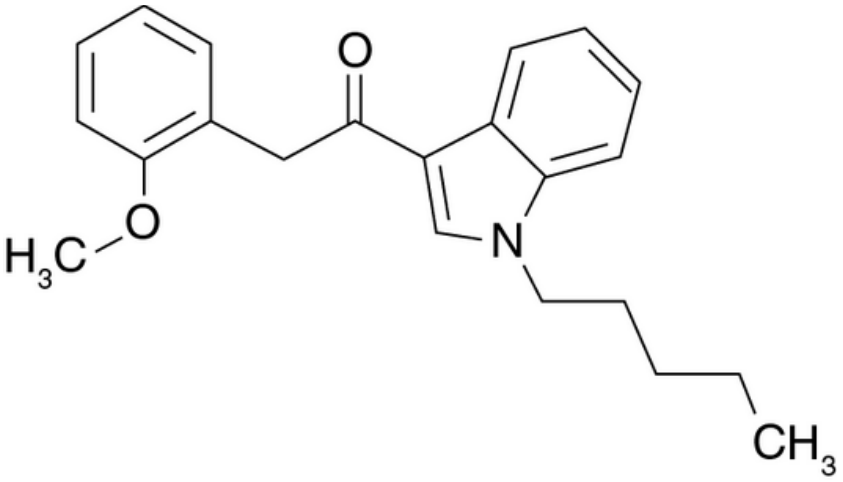


Рис. 6-50. Структурная формула вещества JWH-250

2-(2-метоксифенил)-1-(1-пентил-1Н-индол-3-ил)этанон

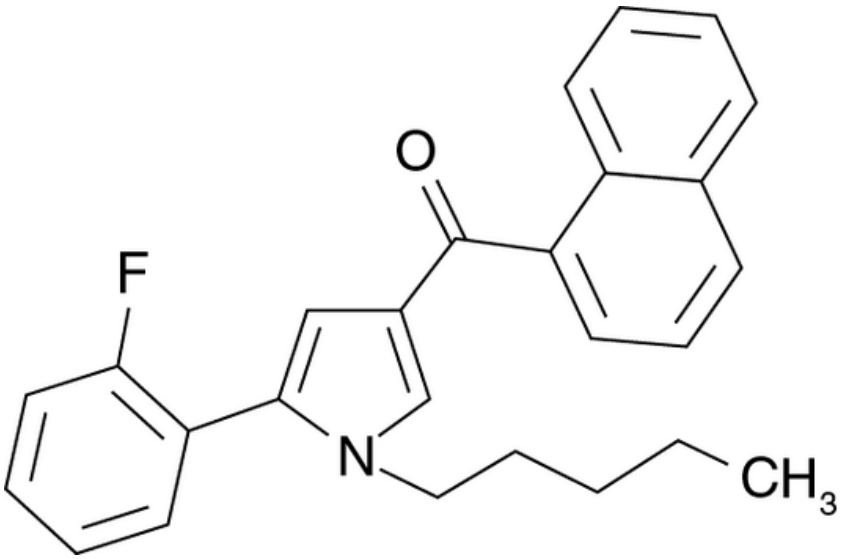


Рис. 6-51. Структурная формула вещества JWH-307 [5-(2-фторфенил)- 1-пентилпиррол-3-ил]-нафтален-1-илметанон

Токсикокинетика и биотрансформация

Огромное число синтезированных каннабимиметиков, разнообразие их химической структуры, низкие концентрации в биообъектах, законодательные ограничения на оборот таких веществ — все это создает серьезные трудности и для изучения их токсикокинетики и биотрансформации.

В настоящее время известно, что практически все синтетические каннабимиметики обладают высокой липофильностью. Изучение биотрансформации на примере нафтоилиндолов, в частности вещества JWH-018, свидетельствует о том, что это вещество в кровеносном русле пребывает короткое время, в плазме крови 90% максимальной концентрации нативного соединения исчезает за 3 ч после курения.
В моче не выявляется нативное соединение, то есть вещество метаболизирует практически полностью и выводится в виде метаболитов. Основным путем биотрансформации является гидроксилирование исходной структуры в индольном и нафталиновом фрагментах, а также в боковой цепи. Идентифицированы продукты карбоксилирования, дигидроксилирования индольного и нафталинового фрагментов, дигидроксилирования и восстановления нафталинового фрагмента, дезалкилирования, совмещенного с гидроксилированием индольного фрагмента. Преобладающими метаболитами являются гидроксилированные по N-алкильной цепи. На рис.6-52 представлены основные метаболиты I фазы биотрансформации на примере соединения JWH-018, которые присутствуют в моче в виде полярных соединений. Указанные метаболиты могут находиться в различных сочетаниях.

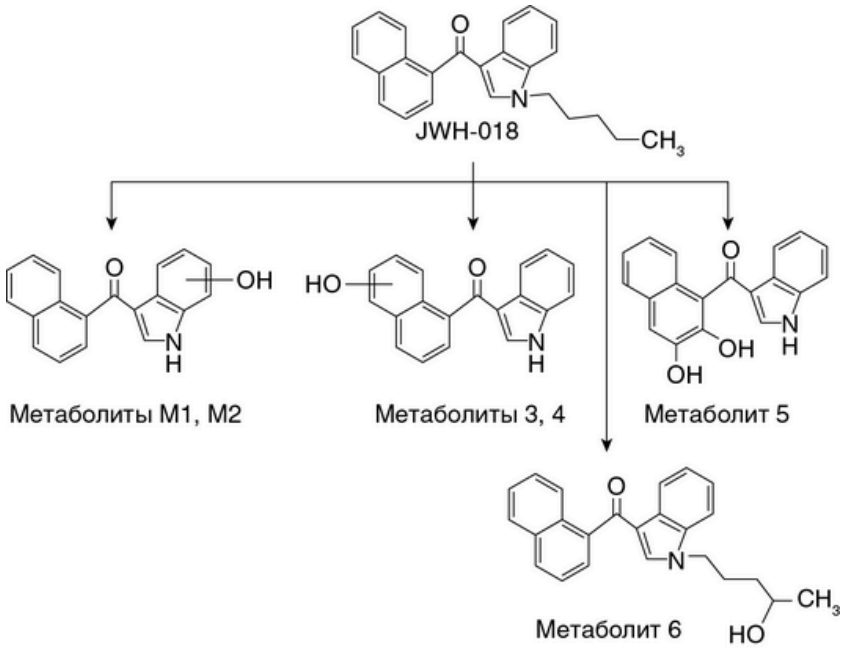


Рис. 6-52. Схема I стадии биотрансформации синтетического каннабимиметика JWH-018

На II стадии биотрансформации — фазе конъюгации — гидроксилированные метаболиты связываются с глюкуроновой кислотой и сульфат-ионами и в виде конъюгатов выводятся из организма.

Подобная схема биотрансформации обсуждается и для других синтетических каннабимиметиков, безусловно, с учетом химической структуры исследуемого вещества.

Трудности при исследовании биологического материала связаны с тем, что в нативном виде (как показало изучение метаболизма большого числа соединений) эти вещества практически не выводятся.

Методы определения

В криминалистическом анализе с помощью светооптической микроскопии исследуется растительная субстанция (подложка) с целью исключения частиц растений, которые находятся под законодательным контролем: конопля, шалфей предсказателей, голубой лотос, мак, семена гавайской розы. Для выявления характерных морфологических признаков растений готовят препараты из растительного сырья в водно-глицериновой смеси по стандартной методике и исследуют с помощью светооптического микроскопа. При необходимости установления принадлежности разных объектов к изначально единой массе также требуется установление состава растительной подложки. В большинстве случаев производители наркотических средств, содержащих синтетические каннабимиметики, выбирают для нанесения действующего вещества лекарственные травы, которые не вызывают существенных фармакологических эффектов при их выкуривании (примеры см. выше).

Метод ТСХ мало пригоден для исследования вещественных доказательств, содержащих синтетические каннабимиметики, в связи с тем, что в незаконном обороте находятся сотни таких веществ. Следовательно, для работы методом ТСХ необходимо иметь и сотни веществ-«метчиков», которые надо хроматографировать совместно с исследуемым образцом, что на практике невыполнимо. В литературе имеется информация, что многие из этих соединений вступают в реакции окрашивания с рядом реагентов, по некоторым веществам даже есть данные о величине Rf, однако надо понимать, что из-за огромного числа находящихся в незаконном обороте синтетических каннабимиметиков применение метода ТСХ стало нереализуемым.

Для предварительного определения при исследовании вещественных доказательств, содержащих синтетические каннабимиметики, применим метод УФ-спектроскопии. Для идентификации веществ используют методы ГЖХ и ВЭЖХ.

К подтверждающим методам исследования относятся ГХ-МС, ИК- и ЯМР-спектроскопия (см. гл. 5). Наиболее широкое применение нашел метод ГХ-МС. Пробоподготовка сводится к экстрагированию растительной массы в соответствующем органическом растворителе и фильтровании. Затем проводится хроматографирование на

колонках со слабополярной неподвижной жидкой фазой и масс-спектрометрическое детектирование. Практически все эти вещества (за исключением некоторых термолабильных) имеют характерные и воспроизводимые МС электронной ионизации, содержат в МС пик молекулярного иона. Поэтому с помощью компьютерного поиска по имеющимся библиотекам МС можно уверенно идентифицировать исследуемое соединение.

На рис. 6-53 и 6-54 представлены МС синтетических каннабимиметиков JWH-018 и JWH-250 соответственно.

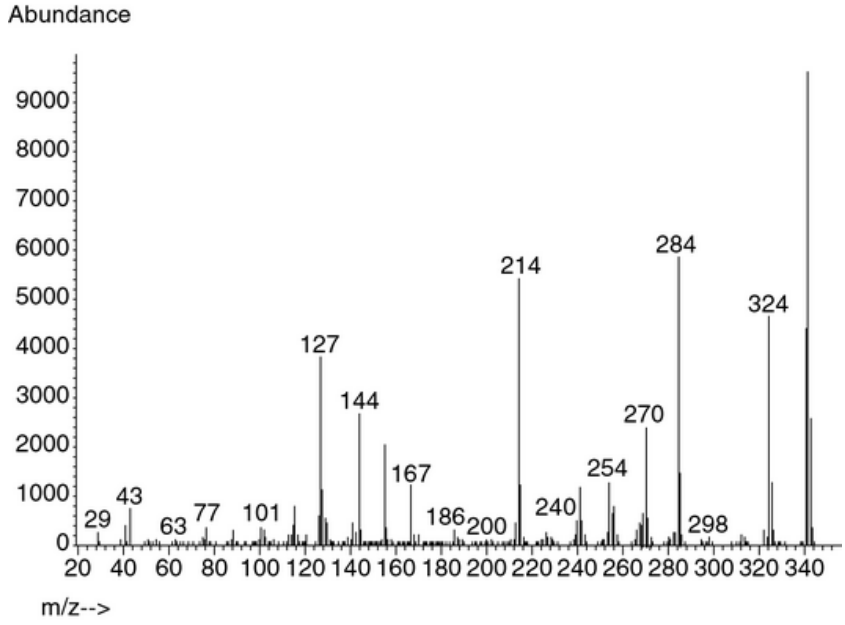


Рис. 6-53. Масс-спектр синтетического каннабимиметика JWH-018

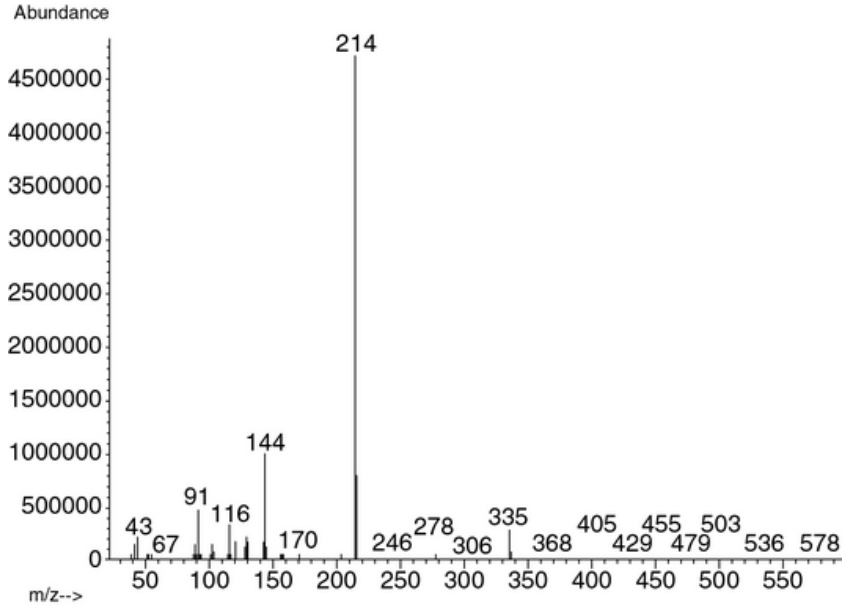


Рис. 6-54. Масс-спектр синтетического каннабимиметика JWH-250

Исследование биологического материала. Методы иммунохимии используют для предварительного определения метаболитов синтетических каннабимиметиков (см. п. 5.2). Материал для исследования — моча, слюна, в перспективе — кровь. Для обнаружения ряда веществ разработаны тест-системы. Однако из-за многообразия групп синтетических каннабимиметиков не исключено, что конкретная группа токсикантов может быть не включена в тест-систему, и тогда будет получен отрицательный результат несмотря на то, что метаболиты наркотика в образце присутствуют.

Метаболиты синтетических каннабиноидов выводятся в очень низких концентрациях, поэтому для их определения требуются высокочувствительные подтверждающие методы, такие как ГХ-МС и ВЭЖХ-МС.

Неизмененное нативное соединение (вместе с его метаболитами) может быть обнаружено в крови, волосах, ногтях, тканях и органах. В моче могут обнаруживаться только метаболиты синтетических каннабимиметиков (см. выше).

Метод ГХ-МС довольно широко используют при исследовании синтетических каннабимиметиков, в том числе выделенных из биологических объектов. Для поиска полярных метаболитов в моче предварительно проводят *дериватизацию*. С этой целью используют преимущественно многочисленные силилирующие реактивы.

При исследовании мочи методом ГХ-МС проводится пробоподготовка, включающая гидролиз для разрушения конъюгированных соединений, а затем жидкость-жидкостная или твердофазная экстракция.

Метод ВЭЖХ-МС предпочтителен для обнаружения синтетических каннабимиметиков и особенно их метаболитов, так как позволяет обнаружить не только исходное вещество, но и множество полярных соединений, образовавшихся вследствие биотрансформации, не прибегая к разрушающим методикам в пробоподготовке, таким как гидролиз и нагревание. Кроме того, этим методом исследования анализируют термолабильные синтетические каннабимиметики. В работе могут быть использованы все виды детекторов: электронная ловушка, времяпролетный, квадрупольный, тандемный. Как известно (см. п. 5.3), пробоподготовка для метода ВЭЖХ-МС более быстрая и менее трудоемкая.

Заключение

К настоящему времени обнаружены и изучены синтетические каннабимиметики многих групп: производные индол-3-карбоксамидов, индазол-3-карбоксамидов, индол-3-карбоксилатов, индазол-3-карбоксилатов, нафтоилиндазолов, 2-нафтоилбензимидазолов и др. Поиск новых психоактивных веществ идет постоянно, поэтому, к большому сожалению, не исключено появление новых групп синтетических каннабимиметиков.

Сегодня по-новому звучит строка одного из наиболее значимых поэтов XX в. В.В. Маяковского:

Курить бросим,
Яд в папиросе.

Глава 7. Метаболизм и определение токсикантов различных химических групп
7.1. Экспертиза алкогольного опьянения

Умный борется со страстью,
глупец становится ее рабом.

Эпиктет, древнегреческий философ (50–135 гг.),
раб, позже вольноотпущенник в Риме

Другие пороки притупляют разум,
пьянство же разрушает его.

Мишель де Монтень (1533–1592),
французский писатель
и философ эпохи Возрождения,
автор известной книги «Опыты»

Основное число отравлений обусловлено употреблением спиртосодержащей продукции (42%). В структуре общей смертности случаи смерти от употребления алкоголя составляют 1,85%. Статистика подразделяет летальные исходы на интоксикацию алкоголем, пагубное употребление, алкогольные психозы. В России от злоупотребления алкоголем умирает в 2 раза больше людей, чем при ДТП. В данную статистику не входят летальные случаи вследствие отравлений не этанолом, а другими спиртами, едкими жидкостями, принятыми в состоянии алкогольного опьянения (метанолом, изопропанолом, уксусной кислотой, средством «Крот» и др.), болезни, ассоциированные со злоупотреблением алкоголем, смертельные травмы, полученные в состоянии алкогольного опьянения. До 2019 г. в России отмечалось стабильное снижение употребления алкоголя и смертности от его употребления, однако в 2020 г. данные показатели опять повысились.

По данным ВОЗ, ежегодно в мире от алкоголя умирает около 5% людей в возрасте от 5 до 29 лет.

Этанол служит сырьем для получения многих химических веществ, широко применяется в медицине, пищевой, лакокрасочной, парфюмерной и фармацевтической промышленности, в производстве товаров бытовой химии, является консервантом, компонентом антифриза и т.д. Этанол постоянно поступает в организм человека в небольших количествах (до 4–5 г в сутки) с некоторыми пищевыми продуктами. Этанол как топливо не является источником парниковых газов.

Получение этанола

Существует два основных способа получения этанола:

* микробиологический (гидролиз и брожение) из пищевого (свекла, крахмал, картофель) и непищевого (гидролизные субстраты древесины, стебли кукурузы, рисовая солома, отходы лесной промышленности и целлюлозно-бумажного производства) сырья; * синтетический (прямой или с использованием серной кислоты).

По способу получения и на основе происхождения сырья выделяют:

* синтетические этиловые спирты, полученные прямой гидратацией этилена или его гидратацией с применением серной кислоты; * ферментативные этиловые спирты, полученные путем сбраживания растительного сырья (пищевого и непищевого) ферментами дрожжевых грибов рода Saccharomyces.

Для медицинского применения по решению Фармакологического комитета России разрешены спирты, получаемые *только из пищевого сырья*.

Синтетический этиловый спирт внесен в Список ядовитых веществ и запрещен для наружного применения у людей.

Полученные тем или иным способом спирты, как правило, содержат характерные примеси.

Схема экспертного исследования спиртов с целью определения вида используемого при их изготовлении сырья состоит из нескольких этапов:

* изучение внешних признаков представленных на исследование объектов (прозрачность жидкости, цвет, запах, наличие посторонних примесей, особенность укупорки и др.); * проведение газохроматографического исследования жидкости; * проведение изотопного анализа жидкости.

Фармакологическое действие

Рецепторов, специфичных к этанолу, в организме человека не существует. Однако он взаимодействует со многими вне- и внутриклеточными рецепторами клеток различных тканей, а также со вторичными посредниками рецепторов и ферментными системами клеток.

Более 10 лет назад ученые обнаружили участок белкового калиевого канала (GIRK) в мембране клеток, с которым непосредственно связывается молекула этанола, способствуя открытию этого канала. Каналы GIRK обнаружены в различных нейронах и могут опосредованно активироваться АХ, норадреналином, дофамином и другими нейромедиаторами. Наибольшее значение, по-видимому, имеет действие алкоголя на калиевые каналы, связанные с ГАМК~В~-рецепторами в областях мозга, ответственных за формирование памяти, принятие решений и импульсивное поведение, а также за судорожную активность. Ранее было известно, что алкоголь ухудшает сообщение между нейронами определенных структур мозга, однако точный механизм его действия выяснен не был.

По своему действию этиловый спирт является депримирующим (успокаивающим) средством, однако прием небольших доз спирта способен активировать ЦНС за счет стимуляции возбуждающих медиаторных систем головного мозга.

При выраженной интоксикации этанолом возбуждаются тормозные системы ЦНС, особенно ГАМК- и опиатзависимые, что проявляется угнетением сознания, нарушениями дыхания и гемодинамики. Этанол растворяется в фосфолипидном слое биологических мембран и кардинально изменяет их свойства, снижая

чувствительность рецепторов к лекарственным препаратам, тем самым усиливая их токсичность. Между этанолом и лекарственными веществами часто возникает конкуренция за ферментные системы, осуществляющие биотрансформацию ксенобиотиков, что проявляется большим количеством неблагоприятных реакций, возникающих в результате сочетанного приема этих веществ. Клинические проявления действия этанола разнообразны и возникают вследствие воздействия на различные рецепторы. При воздействии на адренергические рецепторы развиваются возбуждение, аритмия, гипокалиемия, метаболические нарушения. При воздействии на дофаминергические рецепторы возникает «неправильное» поведение, неврологическая симптоматика, изменения личности, формирование привыкания, воздействие на глутаматные рецепторы проявляется судорогами, гипергликемией, цитотоксическим действием, паркинсонизмом, при воздействии на холинергические рецепторы возникает брадикардия, гипергидроз, когнитивные расстройства. Депримирующее действие, диарея, нарушения терморегуляции, когнитивные расстройства обусловлены действием этанола на серотонинергические рецепторы. При воздействии на ГАМКергические рецепторы возникает оглушение, судороги, гипокалиемия, при воздействии на опиатные рецепторы — аналгезия, эйфория, обнубиляция сознания, кома, привыкание, при воздействии на лейкотриенергические рецепторы — эндотоксемия. Повышение гидрофильности ткани мозга и легких — следствие воздействия на вазопрессинергические рецепторы.

В крови любого трезвого человека присутствуют следы этанола, образующегося в результате биохимических процессов, — так называемого *эндогенного*Уровень эндогенного этанола тем выше, чем менее специфичен метод определения по отношению к этанолу. *этанола*. Его источником является ацетальдегид, который образуется в результате декарбоксилирования пировиноградной кислоты (пирувата) при участии пируватдегидрогеназного комплекса.

Количество эндогенного этанола зависит от многих факторов и особенностей метаболизма разных людей, поэтому колеблется в довольно широких пределах. Допускается также возможность образования этанола микрофлорой кишечника и дыхательных путей. Концентрация эндогенного ацетальдегида в организме примерно в 100–1000 раз меньше, чем эндогенного этанола. Эндогенный ацетальдегид превращается в этанол в результате обратимой реакции, катализируемой алкогольдегидрогеназой. Уровень эндогенного этанола в организме составляет ***в среднем менее 1 мг / л*** при определении наиболее специфичным и чувствительным методом — ГХ-МС. Концентрации эндогенного этанола и его метаболитов находятся в динамическом равновесии друг с другом.

При приеме спиртного (более 60 г / сут) равновесие может нарушаться и изменять биохимические циклы жизнеобеспечения организма. В нейронах и клетках паренхиматозных органов этанол начинает угнетать гексокиназную ферментную систему, обеспечивающую транспорт глюкозы через клеточные мембраны и образование глюкозо-6-фосфата. Продукты биотрансформации этанола, такие как ацетальдегид и уксусная кислота, также взаимодействуют с ферментными системами нейронов, гепатоцитов, миокардиоцитов и влияют на обмен веществ в них.

Следствием действия этанола и его метаболитов является увеличение концентрации НАДН в клетках многих органов и снижение в них концентрации НАД^+^. Нарушение равновесия в системе окислительно-восстановительных коферментов дегидрогеназ приводит к блокаде глюконеогенеза, особенно в печени и почках, сбою цитратного цикла и биосинтеза нейтральных жиров в них.

Проявлениями *острого действия этанола* служат затруднение процессов внутриклеточного образования энергии, изменение работы ЦНС, гипогликемия, а в дальнейшем отложение жира в паренхиматозных органах и нарушение их функции в целом. Основным критерием, отражающим степень клинических расстройств при острой интоксикации этанолом, является его концентрация в плазме крови (табл. 7-1).

Патохимические изменения, возникающие в клетках при приеме этилового спирта, лежат в основе нарушений деятельности синаптических, гормональных, цитокиновых и других систем организма.

Клиническая картина интоксикации. Признаки интоксикации этанолом, по мнению экспертов ВОЗ, возникают при его концентрации в плазме крови 1,0 г / л и с прекращением в связи с этим процесса глюконеогенеза. Выраженные клинические признаки интоксикации наблюдаются при концентрации от 1,5 г / л и более (см. табл. 7-1).

Таблица 7-1. Концентрация этанола в плазме крови и соответствующие ей клинические проявления

Концентрация этанола в плазме крови и степень интоксикации	Клинические проявления
0,5 г / л	Без видимых отклонений в поведении и самочувствии, изменения регистрируются только с помощью специальных тестов
1,0–1,5 г / л: эйфория	Увеличение контактности, говорливость, повышенная самооценка, снижение внимания, нарушение выполнения заданий при тестовой оценке
1,5–2,5 г / л: возбуждение	Эмоциональная лабильность, снижение скорости тормозных реакций, критичного отношения к себе и окружающим, нарушение памяти, способности сосредоточиться, восприятия, мышечная дискоординация
2,5–3,0 г / л: оглушение	Дезориентация, вязкая речь и спутанность сознания, головокружение, гиперэмоциональность (страх, злоба, грусть и т.д.), сенсорные нарушения (диплопия, нарушение ориентации в пространстве, восприятия запахов, цвета, формы объектов и т.д.), повышение порога болевой чувствительности
3,5–4,0 г / л: сопор*	Нарушение сознания до глубины сопора; выраженное снижение ответа на стимулы, полная мышечная дискоординация, неспособность стоять, сидеть; рвота, непроизвольные мочеиспускание и дефекация, гипотермия, гипогликемия, судорожный синдром
4,0–5,0 г / л — кома	Анестезия, аналгезия, снижение рефлексов, гипотермия, нарушение дыхания и гемодинамики, возможна смерть
7,0 г / л и выше	Смерть от остановки дыхания

* Сопор — состояние, характеризующееся утратой сознания при сохранении некоторых рефлекторных форм деятельности. Человек, находящийся в сопоре, может реагировать на словесные обращения, воспринимать внешние возбуждения (свет, болевые воздействия), но по их окончании снова впадает в прежнее состояние. При выходе из него воспоминания о прошедшем периоде отсутствуют или носят отрывочный характер. Состояние сопора обычно является следствием тяжелого поражения головного мозга и может предшествовать коме.

При *легкой степени интоксикации***,** соответствующей концентрации этанола в плазме крови от 1 до 1,5 г / л, доминирует стимулирующее действие этанола, возникает эйфория, однако снижается критическая оценка окружающей обстановки, возникает переоценка своих сил и возможностей. Эта степень отравления лечения не требует.

При *средней степени интоксикации*, соответствующей концентрации этанола в плазме крови 1,5–2,5 г / л, первоначально могут возникать изменения эмоционально-волевой активности, связанные с депримирующим действием этанола. Усиливаются импульсивность и половое влечение, однако у части мужчин снижаются возможности для его реализации. Некоторые лица становятся чрезмерно эмоциональными, контактными, аффективными, конфликтными, агрессивными, другие замыкаются и становятся безучастными или тревожными. По мере биотрансформации выпитого этанола и накопления ацетальдегида краснеет кожа, усугубляются вегетативные реакции, возникают одышка, тахикардия, снижается АД. В диапазоне концентраций, условно соответствующих II степени отравления этанолом, часто выявляется толерантность к нему, хотя у некоторых субъектов уровень 1,5–2,0 г / л вызывает тяжелый сон, а другим требуется проведение лечебных мероприятий и госпитализация в стационар.

При *тяжелой интоксикации*, соответствующей концентрации 2,5–3,0 г / л выражено депримирующее действие этанола, развивается тяжелый сон, снижается АД, у некоторых лиц отмечается брадикардия. По мере декомпенсации гемодинамики формируются тахикардия, апноэ. Снижаются рефлекторные реакции (тактильные, болевые), сознание угнетается вплоть до комы.

Алкогольная кома наблюдается при концентрации этанола 5,0 г / л (иногда — при концентрации более 3,5 г / л). Первичная кома обусловлена депримирующим и наркотическим действием этанола на ЦНС. Она возникает в ближайшие часы после его приема в большом количестве. Во многих случаях налоксон и глюкоза оказывают

пробуждающее действие. При первичной коме имеют место гипотензия, тахикардия, может отмечаться транзиторная неврологическая симптоматика (снижение порога болевой чувствительности, повышение или снижение тонуса мышц, сухожильных рефлексов, «игра зрачков» и т.д.). За тяжелой интоксикацией и алкогольной комой следуют осложнения: декомпенсация дыхания, гемодинамики, а впоследствии и когнитивных функций, что требует интенсивного лечения.

Большинство *смертельных исходов*, связанных с приемом алкоголя, происходит при концентрации этанола в плазме крови около 3,5–4,0 г / л с колебанием от 2,6 до 15,0 г / л.

Смерть при отравлении этанолом развивается вследствие *остановки дыхания* и/ или *острой сердечно-сосудистой недостаточности*. Ее причинами могут быть нарушения со стороны:

* ЦНС (отек мозга, субарахноидальное кровоизлияние, энцефалопатия); * респираторной системы (западение языка и обструкция дыхательных путей вследствие аспирации рвотных масс и/ или асфиксии); * сердечно-сосудистой системы (ранние коллапсы вследствие депримирующего действия этанола, поздние коллапсы, обусловленные миокардиодистрофией, кардиомиопатией, нарушениями ритма сердца); * печени (токсическая гепатопатия); * обмена веществ (гипогликемия, алкогольный кетоацидоз); * в результате переохлаждения (центральная гипотермия).

Перечисленные осложнения могут быть взаимосвязаны или сочетаться друг с другом.

Токсикокинетика и биотрансформация

Необходимо знать особенности токсикокинетики этанола, для того чтобы правильно оценивать соотношение между принятой дозой спиртных напитков, концентрацией этилового алкоголя в плазме крови и возникающими при этом клиническими признаками отравления, а также прогнозировать возможные осложнения, проводить своевременное и адекватное лечение.

Принятые внутрь спиртные напитки всасываются преимущественно в тонкой кишке, лишь 20% дозы всасывается в желудке. На полноту абсорбции этанола и его концентрацию в плазме крови оказывают влияние принятые ранее или совместно с алкоголем другие биоактивные вещества или лекарственные препараты.

У здоровых людей «на голодный желудок» абсорбция этилового спирта завершается в течение 1 ч после однократного приема спиртных напитков. Пища существенно задерживает их абсорбцию. Быстрее всасываются 20% растворы этанола, особенно в сочетании с гидрокарбонатными водами, концентрированные растворы всасываются медленнее за счет вызываемого ими пилороспазма и задержки выпитого в желудке. Активированный уголь не влияет на скорость абсорбции этанола, однако уголь адсорбирует другие вещества, находящиеся в алкогольном напитке (ацетальдегид, этилацетат, сивушные масла, фурфурол и др.).

В желудке происходит пресистемный метаболизм этанола, т. е. его разрушение с помощью фермента алкогольдегидрогеназы, вырабатываемого преимущественно микробной флорой желудка. С этим процессом связаны нарушения, возникающие у пациентов с отягощенным анамнезом при алкогольной интоксикации.

Объем распределения этанола в организме человека (V~d~) составляет 0,53 л / кг, скорость распределения в жидких средах прямо пропорциональна скорости кровотока в них.

При попадании в организм алкоголь через некоторое время начинает перераспределяться между тканями. Среднее значение его концентрации при этом оценивается по сравнению с концентрацией в крови. В табл. 7-2 приведено распределение этанола в некоторых тканях, органах и биологических жидкостях по отношению к распределению в крови.

Таблица 7-2. Отношение распределения этанола в тканях, органах и биологических жидкостях к распределению в крови

Мозг	Сгусток крови	Жировая клетчатка	Печень	Слюна	Стекловидное тело
0,65–0,94	0,77	0,02	0,91	1,12	0,99–1,33

Этанол накапливается в грудном молоке и активно выводится молочными железами. Обычно его *концентрация в грудном молоке превышает на 10% концентрацию в плазме крови*.

Биотрансформация этанола представляет собой типичную реакцию *токсикации* (см. гл. 3), при которой образуются более токсичные по сравнению с исходным продуктом метаболиты. Почками и легкими выводится в неизмененном виде 10% принятого внутрь спирта, остальное количество окисляется в печени. Биохимические процессы, которые происходят при биодеградации этилового спирта, очень важны для понимания природы осложнений, возникающих при интоксикации им.

Основной путь биотрансформации этилового спирта — его окисление цитозольной алкогольдегидрогеназой до ацетальдегида, который далее окисляется в митохондриях гепатоцитов альдегиддегидрогеназой до уксусной кислоты. Последняя утилизируется в цикле Кребса, если для этого есть условия: нормальное давление кислорода в крови, активное протекание гликолиза в гепатоцитах, достаточное количество гликогена в них, наличие запасов окислительно-восстановительных коферментов (пиридиннуклеотидов, флавиновых коферментов, липоевой кислоты, тиамина и др.), что обычно бывает у здоровых непьющих людей. Обе дегидрогеназы расщепляют этанол с постоянной скоростью, которая составляет 7–10 г этанола в 1 ч, потребляют НАД^+^, который восстанавливается до НАДН. Чем больше этанола принято человеком, тем меньшими становятся запасы НАД^+^ в клетках.

Таким образом, этанол, вызывая истощение запасов НАД^+^, нарушает и ход важнейших биохимических реакций, в которых участвует НАД^+^. Одной из таких реакций является глюконеогенез (ресинтез глюкозы *de novo* из аминокислот, жиров и лактата). Глюконеогенез является главным источником питания для нейронов головного мозга и поддерживает энергообразование в клетках печени и почек.

Если концентрация НАД^+^ недостаточна, то глюконеогенез резко замедляется, возникают гипогликемия, голодание мозга, снижаются оборот нитратного цикла и продукция тепла. Существует запасной вариант синтеза глюкозы из гликогена (гликогенолиз), однако даже в здоровой печени запасы гликогена невелики и их хватает в среднем на несколько часов, максимум на сутки. На какое-то время гликогенолиз покрывает расход глюкозы нейронами мозга (и другими тканями), а затем истощение запасов гликогена усугубляет гипогликемию и вызывает связанные с ней осложнения. У голодных людей, лиц, находящихся на диете, больных диабетом, пациентов, принимающих гипогликемические (за исключением толбутамида) или гепатотоксичные (парацетамол, изониазид, альдомет, фенотиазины, некоторые антибиотики и др.) средства, а также у алкоголиков запасы гликогена в печени снижены, и прием небольшого количества спиртного может приводить к неблагоприятным последствиям.

Осложнения, которые возникают после приема этилового спирта у лиц со сниженным запасом гликогена в печени, могут наблюдаться при воздействии больших количеств этанола и его концентрации в плазме крови от 1,5 до 3 г / л и более, особенно если пациент, принявший его, был голодным.

Вторым по значимости путем биотрансформации этанола является его окисление в эндоплазматическом ретикулуме микросом (микросомальная этанолокисляющая система — МЭОС) с участием цитохрома *P*450 (тип *CYP2D*6 — дебризохингидроксилаза). Этот путь биотрансформации включается при уровне этанола в плазме крови в среднем 1 г / л. При сформированной зависимости от этанола система МЭОС работает наравне с биотрансформацией дегидрогеназами, что при сохраненной функции печени проявляется повышенной толерантностью пациента к действию спиртного («пьет как лошадь»). Окисление алкоголя в системе МЭОС также приводит к образованию ацетальдегида, а в результате реакции блокируется окислительное фосфорилирование. Таким образом, при гликолизе образуется только тепло: субъективно становится жарко, объективно снижается толерантность к холоду. Это обстоятельство является причиной замерзания пьяных людей, так как они не чувствуют холода. Также отмечена прямая пропорциональная зависимость между глубиной интоксикации, гипотермией, гипогликемией и нарушениями ритма сердца при острой интоксикации этанолом.

Помимо биотрансформации этанола цитохромы участвуют и в метаболизме многих лекарственных веществ, причем некоторые лекарства способны изменять их ферментативную активность и тем самым опосредованно воздействовать на метаболизм этанола. Прием этанола на фоне индукторов активности цитохромов (дифенина, карбамазепина, рифампицина и др., см. гл. 3) приводит к ускорению его ферментного катализа и быстрому образованию ацетальдегида. На фоне блокаторов цитохромов (сертралина, циметидина, цизаприда и др., см. гл. 3)

уровень этанола в плазме крови будет высоким, что приводит к несоответствию количества выпитых спиртных напитков и реального состояния больного при осмотре. При этом как индукторы, так и блокаторы способны вызывать побочные эффекты.

Третьим путем биотрансформации этанола является окисление в пероксидкаталазной системе микросом клеток печени, в результате которого образуется, помимо ацетальдегида, эндопероксид и НАДФН. Это приводит к дефициту НАДФ^+^ и торможению окислительного фосфорилирования.

Выведение. В неизмененном виде почками и легкими выводится до 10% принятого внутрь спирта. При интоксикации *легкой и средней* степени выведение этанола из организма подчиняется *кинетике нулевого порядка.* Это означает, что в единицу времени окисляется фиксированное количество спирта, несмотря на его концентрацию в плазме крови.

При *тяжелой* степени отравления в силу сочетанной работы всех ферментных систем биотрансформации этанола скорость его выведения из организма возрастает и подчиняется *кинетике 1-го порядка*: чем больше введено, тем больше выводится.

Средняя скорость метаболической элиминации у взрослого человека составляет 7–10 г этанола в 1 ч, что сопровождается снижением его концентрации в плазме крови на 0,15–0,20 г / л в 1 ч.

У алкоголиков в силу сочетанной работы двух метаболических систем расщепление этанола происходит с большей скоростью, которая достигает 0,30–0,40 г / л в 1 ч. *У детей* она составляет 0,28 г / л в 1 ч.

Легочный путь экскреции этанола незначителен и составляет 0,05% его уровня в плазме крови. Однако он имеет значение с точки зрения *диагностики алкогольного опьянения* (см. далее). Считается, что порог ощущения запаха алкоголя в выдыхаемом воздухе определяется при содержании этанола в крови не ниже 0,3 г / л, при увеличении этой концентрации до 1,2 г / л запах ощущается у всех людей. При высокой температуре окружающей среды обонятельный порог понижается, а при низкой — повышается. Сохранение запаха зависит от количества выпитого и может косвенно указывать на давность приема спиртного.

Особенности посмертного перераспределения этилового спирта. При смертельных отравлениях этиловым алкоголем обязательно проводится судебно-медицинское исследование трупа, при котором органы и ткани потерпевшего подвергают судебно-химическому исследованию. В постмортальном периоде этанол способен перераспределяться. Важным показателем является его содержание в ликворе, так как накопление этанола в нем отстает по времени от накопления его в плазме крови на 60–120 мин. Отношение концентрации этанола в плазме к его концентрации в цельной крови колеблется от 1,10 до 1,35, составляя в среднем 1,18.

При постмортальном перераспределении в периферических венах обнаруживают меньшие концентрации этанола по сравнению с центральными венами, при этом диапазон концентраций, выявленных в одном и том же трупе, может быть очень большим — от 1,8 до 4,28 г / л (Baselt, 2004). Пример. E. Briglia и соавт. (1992) при изучении результатов судебно-химических экспертиз 60 аутопсий обнаружил, что в 40 из них различия концентраций этанола в крови (бедренная вена / правое предсердие / восходящая аорта) составили 25%, в 16 случаях — от 25 до 50%, в 4 случаях — более 50%.

В табл. 7-3 приведен диапазон концентраций этанола в органах и биологических жидкостях при летальном исходе вследствие приема больших доз алкоголя.

Таблица 7-3. Концентрации этанола в органах и биологических жидкостях при летальном исходе вследствие приема больших доз этанола

Кровь, г / л	Головной мозг, г / 100 г органа	СМЖ, г / л	Печень, г / 100 г органа	Почки, г / 100 г органа	Моча, г / л
0,74 (0,42–1,77)	0,44 (0,31–0,91)	0,58 (0,40–0,82)	0,45 (0,25–1,16)	0,48 (0,29–1,04)	0,62 (0,49–0,94)

Примечание. СМЖ — спинномозговая жидкость. В скобках указан диапазон концентраций.

Этанол может образовываться не только при гнилостном разложении тканей трупа, что приводит к увеличению его концентрации до 2,4 г / л, но и при хранении исследуемых проб, особенно проб мочи. Концентрация этанола в ней может возрастать от 2 до 4,5 г / л за счет его образования из глюкозы, а также под воздействием ферментов некоторых микроорганизмов, например *Candida albicans,* при комнатной температуре. Для устранения этанолпродуцирующего действия микроорганизмов пробы мочи рекомендуют стабилизировать 1% раствором NaF или хранить при температуре не выше 4 °С.

В биологическом материале под влиянием ферментов микроорганизмов происходит не только новообразование этилового спирта, но и пропилового, бутилового, амилового спиртов и их изомеров. Концентрация перечисленных спиртов алифатического ряда в трупном материале может доходить до 1 г/л (или г/кг ткани органов). Это обстоятельство нужно учитывать при интерпретации полученных в результате судебно-химического исследования данных. Метанол в тканях и биологических жидкостях в результате аутолиза не образуется, может присутствовать только метанол экзогенного происхождения. При отборе крови от живых лиц в образцы добавляют антикоагулянты (гепарин, фторид или цитрат натрия), которые служат своего рода консервантами. В такой крови новообразование спиртов не происходит. При замораживании биологического материала при –18 °С гнилостные процессы останавливаются и новообразование не происходит.

Новообразование спиртов алифатического ряда при хранении биологического материала в условиях холодильника при температуре +4 °С наиболее интенсивно идет с 2-й недели, возрастает на 3-й неделе. Таким образом, процесс возникновения спиртов в трупном материале (или в биопробах, не подвергавшихся консервации, от живых лиц), можно рассматривать как *маркер поздних гнилостных изменений* биологического материала.

Биологический материал подвергается воздействию бактериальных ферментов уже на ранних стадиях хранения, либо в самом трупе, обнаруженном на 2-е–3-и сутки после смерти, либо в трупном биологическом материале, доставленном после секции в судебно-химическое отделение на исследование на 2-е–3-и сутки. Уже на 3-и сутки в таком материале обнаруживаются серосодержащие летучие вещества, которые можно назвать *ранними маркерами гнилостных изменений*. Это метантиол, диметилдисульфид, диметилтрисульфид. Происходит ферментативное разложение белка до аминокислот, а затем в результате деструкции серосодержащих аминокислот образуются перечисленные летучие серосодержащие вещества. Обнаружение таких веществ в трупном материале следует расценивать как раннюю стадию гнилостных изменений и в ряде случаев иметь в виду при интерпретации результатов судебно-химического исследования.

Методы определения

Для обнаружения алкоголя у живых лиц используют кровь, мочу, слюну и выдыхаемый воздух; при летальном исходе — ткани органов и биологические жидкости.

В соответствии с Рекомендациями по организации работы по отбору, транспортировке и хранению биологических объектов для проведения химико-токсикологических исследований на наличие алкоголя и его суррогатов, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, вызывающих опьянение (интоксикацию), и их метаболитов (далее Рекомендации) при поступлении в лабораторию все доставленные образцы должны быть тщательно осмотрены и зарегистрированы, при необходимости в журнале приема должны быть сделаны замечания, касающиеся любых нарушений упаковки образца. Информация на пробирках должна точно соответствовать сопроводительной документации. Присвоение специального или штрихового кода образцу позволяет контролировать его прохождение через лабораторию (см. гл. 4).

Определение алкоголя в крови. Степень поражения мозга при острой алкогольной интоксикации, и, следовательно, выраженность клинических и поведенческих признаков интоксикации зависят от концентрации этанола в мозге, которая прямо пропорциональна его уровню в артериальной крови. Забор проб артериальной крови сложен и не используется в экспертной практике у живых лиц. В процессе медицинского освидетельствования (см. далее) используется не артериальная, а венозная кровь. Кровь отбирают только при наличии соответствующих показаний.

Правила забора образцов крови. В соответствии с Рекомендациями кровь забирается из поверхностной вены самотеком в сухой флакон из-под пенициллина, содержащий раствор гепарина (3–5 капель на каждые 10 мл крови). В настоящее время кровь на исследование чаще всего отбирается в заводские вакуумные пробирки с уже внесенным в них антикоагулянтом. Для химико-токсикологического исследования на наличие алкоголя достаточно 2–3 мл крови. Исследование на алкоголь проводится в течение 1 ч после получения биологических проб. Допускается хранение пробы до отправки в химико-токсикологическую лабораторию (при условии асептического отбора) в холодильнике при температуре 0 °С не более 2 сут. В дальнейшем пробы хранятся при температуре не менее –18 °С в течение 3 мес в морозильных камерах. При заборе крови для дезинфекции участка кожи недопустимо использовать средства, содержащие этанол.

При заборе пробы крови обследуемый должен быть проинформирован о необходимости забора данного объекта на анализ, после чего должно быть получено его письменное согласие.

Следует иметь в виду, что при определении алкоголя возможны его потери, а также могут быть получены завышенные результаты.

Потери этанола возможны:

* за счет испарения при хранении образцов в негерметично закрытых емкостях, вне холодильника, в емкостях, объем которых значительно превышает объем образца; * окисления кислородом крови и воздуха, контактирующего с кровью; потери могут составить 0,02 мг / дл в день при 4 °С, 6 мг / дл в день при 37 °С и 43 мг / дл в день при 62 °С (присутствие консерванта влияние не оказывает); * микробной обсемененности (необходимо хранение образцов в условиях пониженной температуры и в присутствии консерванта натрия фторида).

Завышенные результаты определения (увеличение концентрации этанола) могут быть получены из-за использования средств для дезинфекции, содержащих алкоголь.

При интерпретации результатов исследования крови учитывают соотношение концентраций этанола в цельной крови, плазме и эритроцитарной массе; соотношение концентраций этанола в артериальной, венозной и капиллярной крови; степень корреляции концентрации алкоголя в крови с клиническими проявлениями опьянения (табл. 7-4).

Таблица 7-4. Особенности интерпретации результатов определения этанола

Показатель	Примечание
Соотношение концентраций этанола в цельной крови, плазме и эритроцитарной массе	Наибольшее количество этанола содержится в плазме, наименьшее — в эритроцитарной массе: * сыворотка / плазма 1,00±0,01, возможный диапазон 0,98–1,04; * сыворотка (плазма) / цельная кровь: 1,12±0,02 или 1,10, возможный диапазон 1,03–1,24
Соотношение концентраций этанола в артериальной и венозной крови	Концентрации этанола в мозге, легких, почках в наибольшей степени соответствуют концентрации этанола в артериальной крови. Концентрация этанола в мышечной ткани соответствует концентрации этанола в венозной крови. Соотношение концентраций этанола в артериальной, венозной и капиллярной крови зависит от фазы алкогольной интоксикации: * в фазу абсорбции концентрация этанола в артериальной крови выше, чем в венозной; * в фазу элиминации концентрация этанола в артериальной крови ниже, чем в венозной
Степень корреляции концентрации алкоголя в крови с клиническими проявлениями опьянения	Определение наличия алкоголя не позволяет окончательно судить о степени опьянения человека. Это связано с неодинаковой реакцией различных индивидов и непостоянной реакцией одного человека на одни и те же дозы алкоголя, а также фазой алкогольной интоксикации. Выявление в биологических средах организма содержания алкоголя, превышающего эндогенный уровень, свидетельствует о факте употребления спиртных напитков

Концентрация этанола в пробе мочи, взятой из мочевого пузыря	В фазе абсорбции концентрация этанола в моче из мочевого пузыря всегда ниже, чем в крови, в фазе элиминации — выше, чем в крови, поэтому алкоголь может быть определен в моче, когда экзогенный этанол в крови уже отсутствует
	Соотношение между концентрацией этанола в слюне и капиллярной крови в среднем составляет ≈ 1,1 (диапазон 0,88–1,36). В зависимости от времени, прошедшего после последнего приема алкоголя, разность концентраций в венозной крови и слюне может принимать как положительные, так и отрицательные значения.
Концентрация этанола в слюне	Этанол может абсорбироваться на слизистой оболочке ротовой полости и ротоглотки после употребления спиртсодержащих лекарственных препаратов и ряда пищевых продуктов, что повысит концентрацию алкоголя в слюне (в течение 10–20 мин), поэтому при положительном результате следует повторить определение через 20 мин. Анализ слюны проводят при невозможности отбора пробы крови из-за различных причин
Концентрация этанола в выдыхаемом воздухе	Уровень этанола в выдыхаемом воздухе пропорционален его концентрации в *артериальной* крови альвеолярных капилляров (после сброса объема воздуха, заполняющего верхние дыхательные пути, т. е. «мертвого объема»). Коэффициент пропорциональности, или коэффициент Генри, для этанола в системе кровь–воздух значительно варьирует как в популяции, так и у одного человека при использовании различных методов исследований, например от 1555 до 3005 (есть и другие цифры). В каждой стране законодательно принят свой коэффициент пропорциональности. Главные причины изменчивости коэффициента пропорциональности: 1) количество этанола в выдыхаемом воздухе зависит от его концентрации в крови и от общей площади воздушных путей, сильно варьирующей у людей разного пола и массы тела; 2) соотношение концентраций этанола в венозной и артериальной крови (в частности, крови альвеолярных капилляров) зависит от кинетической фазы (см. выше). Выраженность клинических и поведенческих признаков интоксикации зависит от концентрации этанола в мозге, прямо пропорциональной его уровню *в артериальной крови*, следовательно, анализ *выдыхаемого воздуха более информативен* для диагностики состояния опьянения по сравнению с анализом венозной крови. Степень интоксикации выражают непосредственно в единицах концентрации этанола в выдыхаемом воздухе. *ПДК алкоголя в выдыхаемом воздухе равен 0,15 мг / л.* На основании соотношения между двумя *принятыми нормами* — **0,3 г / л крови и 0,15 мг / л выдыхаемого воздуха** — коэффициент пропорциональности, или коэффициент пересчета, принят равным **2000:1** de facto с июля 2008 г. (ранее он составлял 2200:1). На результаты определения влияют употребление спиртсодержащих лекарств и/или продуктов (в течение 10–20 мин), курение из-за восстановительной способности соединения углерода (в течение 5 мин), наличие в окружающей среде (или в ротовой полости) следовых количеств летучих веществ (ацетона). См. ниже раздел **«**Медицинское освидетельствование на состояние опьянения»

Определение алкоголя в моче. Концентрация этанола в пробе мочи, взятой из мочеточников, соответствует концентрации этанола в артериальной крови, поступающей в почку (см. гл. 1). На практике отбирают пробу мочи, содержащейся в мочевом пузыре, где концентрация этанола постоянно меняется из-за вновь поступающих порций мочи.

В соответствии с Рекомендациями для исследования на алкоголь достаточно 2–5 мл мочи; пробу помещают во флакон из-под пенициллина, который закрывают стандартной резиновой пробкой с последующей фиксацией алюминиевым колпачком. Загрязнение образца мочи этанолом извне должно быть исключено.

Определение алкоголя в слюне. Отбор слюны прост в исполнении и сводит к минимуму риск заражения персонала вирусом гепатита или СПИДом.

Слюна (*saliva*) — щелочная жидкость, секретируемая большими слюнными и другими железами слизистой оболочки полости рта. Основными составляющими слюны являются вода (до 99,5%), слизь, ферменты (глюкозидаза и амилаза), мукополисахариды, гликопротеины, иммуноглобулины, соли, электролиты. Слюна очищает полость рта и обладает бактерицидными свойствами. В течение 1 сут образуется около 1 л слюны.

В стрессовой ситуации слюноотделение снижается, поэтому для стимуляции отделения слюны применяют жевательную резинку, жевательный воск, кусочки резины, тефлона или лимонные капли и раствор лимонной кислоты. Надежнее использовать различные приспособления и устройства для отбора слюны, например устройство Salivette^®^ или систему для отбора ультрафильтрата слюны, функционирующую по принципу осмотического насоса.

Определение алкоголя в выдыхаемом воздухе — см. далее раздел **«**Медицинское освидетельствование на состояние опьянения».

При интерпретации результатов определения этанола следует учитывать закономерности его токсикокинетики (см. табл. 7-4).

Первый количественный метод определения алкоголя в крови был разработан в начале XX в. Кларком, модифицирован Видмарком и известен как метод Видмарка.

В настоящее время для определения этанола используются методы, основанные на различных физико-химических принципах (табл. 7-5), обеспечивающие его надежную идентификацию и количественную или полуколичественную оценку. Оборудование, используемое при определении этанола, должно быть включено в Перечень разрешенных к применению медицинских изделий (изделия медицинского назначения и медицинской техники) для скрининговых исследований наличия алкоголя в организме человека или в Перечень приборов, разрешенных к применению в медицинской практике.

Таблица 7-5. Методы определения этанола

Методы	**Способы реализации и оборудование**	**Результат**	**Примечание**
Определение этанола в выдыхаемом воздухе			
Химические	*Проба А. М. Рапопорта*: в две чистые сухие пробирки наливают по 2 мл дистиллированной воды. В одну из них опускают пипетку с узким вытянутым концом, и испытуемый выдыхает через нее 1,9–2,1 л воздуха в течение 20–30 с. В обе пробирки приливают по 20 капель х. ч. H~2~SO~4 ~(конц) и затем по 1 капле 0,5% свежеприготовленного раствора KMnO~4.~	Если спустя 2 мин окраска раствора не изменилась в сравнении с окраской контрольного раствора, экзогенный алкоголь в организме отсутствует. Под воздействием паров этанола реагент восстанавливается — Cr(VI) переходит в Cr(III) и оранжевый (желтый) цвет реагента изменяется на зеленый	Испытуемый на момент исследования под воздействием алкоголя не находится. Не исключены ложноположительные результаты из-за присутствия в пробе других восстанавливающих реагент веществ. Чувствительность определения 0,2‰. При воздействии паров бензина, скипидара, уксусной кислоты, камфоры, фенола, дихлорэтана реагент приобретает темно-коричневую окраску
	Индикаторные трубки Мохова — Шинкаренко «Контроль трезвости»: реагент индикаторных трубок — силикагель, импрегнированный		

	раствором хромового ангидрида в H~2~SO~4~ (конц)		
Электрохимические*	Портативные устройства используют электрохимическую ячейку, в которой этанол на платиновых электродах окисляется до ацетальдегида. Alert J4X (фирма Alcohol Countermeasure Systems, Канада) и Lion Alcolmeter SD-400P (фирма Lion Laboratories Ltd., Великобритания) — приборы для экспрессного измерения концентрации этанола в выдыхаемом воздухе, оснащенные электрохимическим детектором	Показания прибора: концентрация этанола в граммах на 1 л в пересчете на кровь	Метод очень чувствителен, избирателен, обеспечивает хорошую линейность, успешно конкурирует с ИК-анализатором (см. ниже). Метанол, изопропанол и другие летучие вещества, оксляющиеся в этих условиях, дают ложноотрицательные результаты. Изопропанол образуется эндогенно при восстановлении ацетона, уровень которого в крови возрастает при голодании или диабетическом кетоацидозе, что надо учитывать при интерпретации результатов. Электрохимические сенсоры обнаруживают слабую реакцию на ацетальдегид, формальдегид, эфир и оксид углерода, однако их чувствительность по отношению к этим компонентам в 10–15 раз ниже, чем к этанолу
ИК*-спектрометрия (см. табл. 7-7)	Современные ИК-анализаторы используют несколько длин волн. Анализатор Lion Intoxilyzer-5000 — три длины волны: 3,80; 3,48 и 3,39 мкм; Анализатор Lion Intoxilyzer-8000 — две длины волны: 3,40 и 9,36 мкм; анализатор АКПЭ-01 (ЗАО НПФ «Мета», Россия) — одну длину волны: 3,40 мкм	Результат количественного определения этанола фиксируется на бланке и в электронной памяти прибора. Показания АКПЭ-01 — концентрация этанола в микрограммах на 1 л выдыхаемого воздуха	Можно достоверно отличить этанол от других перекрестно реагирующих летучих соединений. Можно выявить присутствие абсорбированного этанола слизистой ротовой полости (по углу наклона градуировочного графика, который резко идет вверх из-за нарастания концентрации этанола в первых порциях выдыхаемого воздуха)
Определение этанола в биологических жидкостях			
Биохимические (энзиматические)	*Тест на алкоголь в слюне:* высокоспецифичная ферментативная реакция окисления первичных спиртов до альдегида и пероксида водорода, который, разлагаясь в присутствии пероксидазы	Концентрацию алкоголя в анализируемом образце определяют с помощью цветовой шкалы по интенсивности окраски. Минимальная опре-деляемая концентрация	Можно определить 0,02; 0,05; 0,1 и 0,2% алкоголя в слюне. Сенсорный элемент чувствителен к метанолу, этанолу, пропанолу и нечувствителен к другим спиртам и ацетону

	хрена, вызывает окисление хромогена и образование окрашенного продукта. Индикаторная шкала содержит пять цветовых зон, соответствующих концентрациям алкоголя 0; 0,2; 0,5; 1 и 2 г / л этанола в крови. Полоски индикаторные АЛКО-СКРИН (1) АЛКОСЕНСОР (2)	этанола — 0,02% алкоголя, что соответствует 0,2 г / л алкоголя в пересчете на кровь. Чувствительность определения: 0,2‰ (для АЛКО-СКРИН) и 0,15‰ (для АЛКОСЕНСОР)	
Иммуноферментные (поляризационный флуоресцентный иммуноанализ — ПФИА)	TDx / TDx-FLx (1), AxSYM (2) — иммунофлуоресцентные анализаторы фирмы Abbot, США	Чувствительность определения: 0,25‰ для проб мочи (1) и для проб цельной крови и мочи (2)	Полностью автоматизированный процесс проведения анализа; реагенты находятся в картриджах и готовы к использованию; длительное хранение реагентов; нет необходимости в ежедневной калибровке прибора; возможность исследования единичных образцов и работа в разных режимах
Хроматографические и в сочетании с масс-спектральным детектированием	ГХ на набивных или капиллярных колонках. ВЭЖХ, ГХ-МС	См. ниже	См. ниже

* В настоящее время используют приборы последнего поколения (Alcotest 7110, Германия), имеющие *комбинированный* детектор, который объединяет инфракрасную абсорбцию при 9,5 мкм и электрохимическое окисление: этанол последовательно измеряется сначала в инфракрасном, затем в электрохимическом сенсоре, что повышает избирательность метода.

Хроматографические методы. Подавляющее количество определений этанола в биологических жидкостях выполняется с применением ГХ с вводом образцов методом равновесной паровой фазы. Различают статический и динамический варианты.

В простейшем *статическом варианте* образец биологической жидкости объемом *V~s~* помещают в виалу (флакон) — герметично закрытый сосуд общим объемом *V~v~*, выдерживают при определенной температуре до установления равновесия между фазами, затем пробу, взятую из газовой фазы (объема *V~g~*), вводят в хроматограф.

Исходную концентрацию летучего компонента *C*~0~ в исследуемом образце определяют по его концентрации *C~g~* в равновесной газовой фазе на основе коэффициента распределения *K* = *C*~l~ / *C~g~*, где *C*~l ~— равновесная концентрация компонента в образце и соотношение объемов газовой (*V~g~*) и жидкой (*V~s~*) фаз, обозначаемое как β. Эта зависимость выражается уравнением

$$A \approx C_0 /(K + \beta)$$

где *A* — отклик детектора в виде высоты или площади хроматографического пика.

Концентрация аналита в газовой и жидкой фазах для закрытой системы подчиняется законам Дальтона, Рауля и Генри.

Чувствительность и точность парофазного метода лимитируются прежде всего процессом газовой экстракции, который наряду с общими закономерностями традиционной жидкостной экстракции имеет ряд существенных особенностей. В табл. 7-6 приведены некоторые из них.

Таблица 7-6. Особенности метода равновесной паровой фазы (парофазного анализа)

Особенности парофазного анализа	Примечание
Коэффициент распределения вещества между жидкой и газовой фазой зависит от температуры	При количественных измерениях необходимо строго соблюдать температурный режим
Парциальное давление газа зависит от температуры и общего давления в системе	При количественных измерениях необходимо строго соблюдать температурный режим
Отсутствие требования полноты извлечения определяемого вещества из исследуемого объекта	Высокая чувствительность газохроматографического детектирования позволяет определять с помощью газовой экстракции даже микропримеси летучих веществ, содержащихся в жидких или твердых объектах, при очень незначительной доле извлеченного вещества
Постоянная температура — фактор обеспечения допустимой погрешности анализа	Достигается при высокой точности термостатирования в анализируемой системе
Постоянная температура — фактор повышения чувствительности метода	Для большинства органических веществ изменение температуры на 10 °С приводит к изменению коэффициента распределения на 3–8%, поэтому для получения точных результатов в процессе установления фазового равновесия необходимо поддерживать температуру стабильной на уровне десятых долей градуса
Содержание определяемого вещества в исследуемом объекте лимитирует линейность концентрационной зависимости коэффициента распределения	Область предельных разбавлений в различных системах ограничивается диапазоном концентраций 0,01–1 г / л
Соотношение объемов жидкой и газовой фаз оказывает сильное влияние на чувствительность и точность определения в случае малых значений коэффициента распределения	Для систем, в которых K >103, при использовании существующих устройств для парофазного анализа соотношение объемов не оказывает влияния на чувствительность и предел обнаружения
Отклонение от равновесных условий проведения парофазного анализа может приводить к трудно выявляемым систематическим погрешностям	—
Время наступления равновесия зависит от температуры и скорости перемешивания фаз	Часто используются различные механические и другие приспособления для перемешивания образца. Обычно время наступления равновесия составляет от нескольких минут до 1 ч
Абсорбция вещества поверхностью жидкой фазы может оказывать существенное влияние на точность определения компонентов раствора, резко отличающихся по полярности от растворителя	Например, углеводороды в воде
При определении веществ, диссоциирующих в растворах, их ионизацией в газовой фазе практически можно пренебречь	—

Результаты анализа зависят от состава образца, в том числе от наличия посторонних ионов в пробе	Добавление электролитов, таких как хлорид, сульфат, фосфат или карбонат натрия, приводит к увеличению отклика детектора (высаливающий эффект)

При применении *динамического* варианта ввода газовой фазы проба термостатируется, затем по системе соединительных трубок переносится в хроматограф. Можно проводить исследования нескольких образцов в автоматическом режиме.

При скрининговых исследованиях большого количества образцов с целью выявления лиц, употреблявших алкоголь, применяют варианты метода равновесной паровой фазы, при которых не дожидаются установления равновесия. Примером такого подхода является *метод парофазного анализа без термостатирования*. При этом решается вопрос только о присутствии или отсутствии в образце контролируемого вещества, например этанола. Результаты количественного определения в этом случае носят ориентировочный характер из-за резкого возрастания неопределенности метода. При необходимости принятия решений, касающихся уголовных дел или вопросов, связанных с санкциями за вождение автотранспорта в нетрезвом состоянии, требуется применение более точных и методически выверенных методов.

До сих пор во всем мире при определении этанола (в том числе в тканях при летальном исходе) широко применяют модификацию парофазного анализа, в которой используется *дериватизация аналитов для получения алкилнитритов при реакции спиртов в кислой среде с нитрит-ионом*. Реакция проходит за несколько секунд при комнатной температуре, образующиеся вещества обладают высоким парциальным давлением и хорошими хроматографическими свойствами. Определение в этом случае проводят с использованием коротких набивных колонок при относительно низких температурах и детектора-катарометра (см. п. 5.3). *Метод надежен при определении этанола только в свежем секционном материале.* Продукты распада тканей даже в незначительных концентрациях искажают результаты.

В качестве альтернативных методов определения этанола и других низших спиртов часто применяют их дериваты с реактивами, обладающими свойством флуоресценции. Полученные дериваты анализируют методом ВЭЖХ. При исследовании биологических образцов, взятых у лиц, принимавших этанол совместно с лекарственными препаратами, возможно образование в пробе веществ, которые могут искажать результаты определения этанола. Например, при взаимодействии *in vivo* этанола с салициловой или ацетилсалициловой кислотой образуется этилсалицилат, определяемый на хроматограмме биологического образца (мочи) вместе с другими веществами.

Биомаркеры потребления этанола и методы их определения. Перед экспертами нередко встает вопрос, когда был введен этанол в организм потерпевшего — при жизни или после смерти. Ответ на него можно получить, используя биомаркеры потребления этанола.

Определение *в моче метаболитов серотонина* — биомаркеров предшествующего приема даже небольших количеств этилового спирта — проводят методом ВЭЖХ. К ним относятся 5-гидрокситриптофол (5-ОНТ) и 5-гидроксииндолуксусная кислота (5-ОНИУК). Концентрация более 15 ммоль/л 5-ОНТ и 100 нмоль/л 5-ОНИУК является специфичным тестом даже по прошествии 6—15 ч после полного выведения экзогенного этанола.

Сальсолинол — продукт конденсации дофамина с пируватом и ацетальдегидом — определяют в плазме крови методом ВЭЖХ. Тест менее чувствительный по сравнению с представленными выше. Концентрация сальсолинола в плазме крови и моче более 0,148 нг/мл указывает на предшествующий прием этанола или хронический алкоголизм в анамнезе.

Повышенная активность *печеночных ферментов* также может указывать на хроническое потребление этанола.

Повышенное количество эритроцитов может наблюдаться у лиц, злоупотребляющих алкоголем. Данный маркер называется *средний корпускулярный объем эритроцитов* (*MCV*). Как предполагают, это обусловлено *дефицитом фолиевой кислоты*, вызванным токсическим действием этанола.

Повышение *активности* ***γ-****глутамилтрансферазы* в сыворотке крови давно используется для оценки изменения метаболизма при злоупотреблении этанолом. Хроническое употребление алкоголя приводит к повышению

активности этого фермента. Тест неспецифичен.

Проба на *глюкопротеиновый трансферрин (карбогидратдефицитный трансферрин, CDT)* является наиболее надежным доказательством чрезмерного употребления алкоголя в предыдущие 2 нед. Специфичность и чувствительность данного биомаркера составляют 92–97 и 55–90% соответственно. Однако повышение количества CDT в крови наблюдается только спустя 2 нед после систематического потребления алкоголя в размере 60–80 г/день в течение 7–10 дней.

Этилглюкуронид относится к прямым биомаркерам потребления этанола. Может быть обнаружен в моче или волосах спустя длительное время после окончания приема этанола методом ВЭЖХ-МС.

Этилсульфат также относится к прямым маркерам потребления этилового спирта. Определяется спустя длительное время после выведения из организма этанола. Стоек при хранении на сухих носителях. В крови и моче сохраняется гораздо лучше, чем этилглюкуронид. И этилсульфат, и этилглюкуронид являются метаболитами этилового спирта, и в гнилостном биоматериале, когда имеет место новообразование этанола, обнаружение этих маркеров свидетельствует о прижизненном употреблении этанола. Определяется в биологическом материале методом ВЭЖХ-МС.

Фосфатидилэтанол повышается даже при разовом употреблении этанола, является его прямым биомаркером. Период полувыведения фосфатидилэтанола составляет 4–10 дней, но в случаях хронического употребления алкоголя накапливается в крови и может быть определен спустя 28 дней после последнего употребления. Специфичность фосфатидилэтанола как биомаркера составляет 100%. Однако в работе надо учитывать, что при хранении биожидкостей в присутствии этанола происходит образование фосфатидилэтанола даже при температуре –20 °С. Этот процесс останавливается только при глубокой заморозке при –80 °С.

Медицинское освидетельствование на состояние опьянения

«Не грусти, — сказала Алиса. —
Рано или поздно все станет понятно,
все станет на свои места и
выстроится в единую красивую
схему, как кружева.
Станет понятно, зачем все было
нужно, потому что
все будет правильно.»

«Алиса в стране чудес» —
автор Льюис Кэрролл (1832–1898), английский писатель,
математик, логик, философ, фотограф

На практике наибольшее внимание уделяется правонарушениям, связанным с управлением транспортным средством водителем, находящимся в состоянии опьянения. *Освидетельствование на состояние опьянения* осуществляют сотрудники ДПС, *медицинское освидетельствование на состояние опьянения* — специально уполномоченные медицинские учреждения. Порядок осуществления медицинского освидетельствования на состояние опьянения регламентируют нормативно-правовые акты.

Федеральный закон «Кодекс Российской Федерации об административных правонарушениях» от 30.12.2001 № 195-ФЗ (с изменениями и дополнениями), а также Уголовный кодекс Российской федерации от 13.06.1996 № 63-ФЗ (с изменениями и дополнениями) определяют наступление административной либо уголовной ответственности в случае установленного факта употребления вызывающих алкогольное опьянение веществ, который определяется наличием абсолютного этилового спирта в концентрации, превышающей возможную суммарную погрешность измерений. Кодекс Российской Федерации об административных правонарушениях конкретизирует, что это 0,16 мг на 1 л выдыхаемого воздуха, или наличие абсолютного этилового спирта в концентрации 0,3 г и более на 1 л крови.

Анализ выдыхаемого воздуха — обязательное условие проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения. Ранее диагноз «состояние опьянения» выносил врач по совокупности клинических симптомов, а определение концентрации этанола в биосредах проводили только с целью объективно подтвердить этот факт и установить причинно-следственную связь между клиническими проявлениями и приемом алкоголя.

В связи с введением понятия «наличие абсолютного этилового спирта в концентрации, превышающей возможную суммарную погрешность измерений» в России принципиально *изменилась и процедура медицинского освидетельствования на состояние опьянения.*

При освидетельствовании используются *технические средства индикации и измерения*, зарегистрированные и разрешенные МЗСР РФ для использования в медицинских целях и рекомендованные для проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения, а также *обязательно сертифицированные*Наличие свидетельства о своевременном метрологическом контроле, который осуществляется в соответствии с указанным в паспорте прибора межповерочным интервалом (обычно 1 г), что свидетельствует об исправности прибора и гарантирует правильность показаний. *Государственным комитетом РФ по стандартизации и метрологии (ГОССТАНДАРТ России), имеющие электронную память* и возможность *фиксации результата на твердом носителе.*

Средства измерения оценивают концентрацию этанола количественно, *средства индикации* — качественно, т. е. указывают на наличие этанола выше определенной пороговой концентрации.

Определение алкоголя в выдыхаемом воздухе — наиболее простой и доступный способ установления факта опьянения, однако полученные результаты измерений часто вызывают сомнения. В связи с этим особые требования предъявляются к качеству измерительной техники и методике проведения анализов.

Оборудование, используемое для определения концентрации этанола в выдыхаемом воздухе, перечислено выше (см. табл. 7-5).

В табл. 7-7 приведены *технические характеристики некоторых приборов*, разрешенных для выявления превышения ПДК в процессе освидетельствования на состояние опьянения.

Таблица 7-7. Характеристика некоторых приборов, разрешенных для определения превышения предельно допустимой концентрации

Фирма, страна	**Модель, питание**	**Рабочий диапазон; масса, кг**	**Минимальный объем ВВ, л**	**Сведения отчета результат**			**Погрешность определения ПДК, мг / л**	**База данных****
				бланк-теста	**Неудач-ный тест***	**Сведения о поверке или калибровке**		
Lion Laboratories Ltd, Великобритания	Lion Alcolmeter SD 400P, Ni-Cd аккумулятор	–5—+40 °C	1,5 Регулируется	Нет	Есть	Есть	±0,05	Есть
Lion Laboratories Ltd, Великобритания	Lion Intoxilyzer 8000, от сети 220 и 10–15 В	0–40 °C, 7	1,5	Есть	Нет	Есть	±0,02	Есть
МЕТА, ЗАО НФП, Россия	АКПЭ-01, от сети 220 и 10–15 В	0–40 °C, 9		Есть	Есть	Есть	±0,02	Нет

* Неудачный тест — тест, при котором выдох не обеспечивает поступление минимально необходимого объема воздуха.

** Компьютерный интерфейс.

Прибор Lion Intoxilyzer 8000 обеспечивает *наибольшую доказательность результатов*:

* анализ окружающего воздуха (бланк-тест) проводится до и после каждого теста, включая неудачный; * отдельный бланк-тест проводится для проверки мундштукаЭта функция защищает достоверность результатов от действий недобросовестных операторов.; * имеет функцию внутренней калибровки, которая автоматически проводится непосредственно перед каждым тестом, поэтому прибор не нуждается в систематической проверке и настройке чувствительности; * результаты калибровки, так же как и всех бланк-тестов, отражены в распечатке; * прибор автоматически отбраковывает результаты, полученные в присутствии абсорбированного алкоголя (см. ниже).

*Отечественный анало*г Lion Intoxilyzer 8000 — *АКПЭ-01* обладает почти всеми перечисленными функциями, включая внутреннюю калибровку и сигнализацию о наличии абсорбированного алкоголя, гипервентиляции легких перед выдохом, но не снабжен компьютерным интерфейсом.

Если медицинская организация, проводящая медицинское освидетельствование, *не располагает подобными приборами*, закон предусматривает возможность вынесения *диагноза по совокупности клинических симптомов*, т. е. как это и было до 01.07.2008.

При этом отбор биообъекта (мочи) для химико-токсикологического анализа в соответствующей лаборатории производится только при наличии выраженной клинической картины опьянения и отсутствии этанола в выдыхаемом воздухе, обнаруженном с помощью имеющихся средств индикации (см. табл. 7-5).

Методика измерений, обеспечивающая достоверность результата, подробно описана в инструкции к приборам.

В России согласно нормативно-правовым актам процедура освидетельствования сотрудниками ДПС предусматривает *одно измерение* концентрации алкоголя в выдыхаемом воздухе.

Единица измерения концентрации алкоголя в выдыхаемом воздухе, законодательно установленная в июле 2008 г., — миллиграмм на 1 литр (мг/л).

Концентрация алкоголя в выдыхаемом воздухе, за которую не предусмотрена ответственность, равна 0,15 мг / л.

Диагноз «алкогольное опьянение» выносится при концентрации этанола, равной или превышающей 0,16 мг / л с учетом предельно допустимой погрешности измерений, указанной в паспорте прибора.

При проведении медицинского освидетельствования необходимо дифференцировать результаты, отражающие концентрацию этанола во внутренней среде от результатов определения уровня абсорбированного алкоголя на слизистой ротовой полости. При приеме внутрь часть этанола абсорбируется слизистой оболочкой ротовой полости, не попадает в системный кровоток, не оказывает влияния на мозг и не может вызвать состояние опьянения.

Через некоторое время этанол вследствие десорбции из стенок слизистой попадает в выдыхаемый воздух, а при проведении теста определяется прибором. Наличие абсорбированного алкоголя может быть обусловлено ополаскиванием рта спиртсодержащей жидкостью или приемом спиртсодержащих лекарств, что также может изменить результаты теста. Исключают влияние абсорбированного алкоголя на результат определения, проводя повторный тест через определенное время, достаточное для его удаления со слизистой ротовой полости. Доказано, что через 15 мин любое количество абсорбированного в ротовой полости алкоголя приближается к нулю.

В России согласно нормативно-правовым актам *проведение второго теста* регламентировано через 20 мин, если результат первого теста положительный, т. е. обнаружено наличие алкоголя в любом количестве, в том числе и ниже порогового уровня.

Ниже описана процедура освидетельствования на состояние опьянения у водителя транспортного средства.

* Сотрудник ДПС (при наличии прибора для определения концентрации этанола в выдыхаемом воздухе, разрешенного Минздравом России для проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения, сертифицированного ГОССТАНДАРТом России, имеющего электронную память и возможность фиксации результата на твердом носителе) проводит единственный тест, имеющий юридическую силу. * Водитель доставляется в кабинет медицинского освидетельствования (или на мобильный пункт медицинского освидетельствования): при отсутствии приборов для определения концентрации алкоголя в выдыхаемом воздухе с фиксацией результатов на твердом носителе у сотрудника ДПС (см. ниже); в этом случае тест, проведенный сотрудником ДПС, считается предварительным и не имеет юридической силы; по требованию водителя; если тест выявил отсутствие или низкий (подпороговый) уровень алкоголя при сильно выраженных признаках опьянения. В кабинете или мобильном пункте медицинского освидетельствования специально подготовленный врач-нарколог сразу по прибытии освидетельствуемого проводит один тест и, если показания прибора больше нуля, то с интервалом 20 мин проводит повторный тест. Результат второго теста является юридически значимым. * Клинические тесты проводят только при отрицательных результатах анализа выдыхаемого воздуха. * При наличии клинических симптомов опьянения у освидетельствуемого отбирается моча для анализа на наркотические и/или лекарственные препараты. Флаконы с мочой опечатывают исключающим несанкционированное вскрытие способом и отправляют в ХТЛ. * Если испытуемый, у которого установлено превышение концентрации 0,16 мг/л алкоголя в выдыхаемом воздухе, не согласен с выводами освидетельствования, он имеет право в течение 2 ч после первого освидетельствования повторить процедуру медицинского освидетельствования в любом другом кабинете медицинского освидетельствования на платной основе, в этом случае у него будет отбираться моча для ХТИ.

Процедура освидетельствования на состояние опьянения у водителя транспортного средства *при отсутствии у сотрудника ДПС прибора* для определения концентрации алкоголя в выдыхаемом воздухе с фиксацией результатов на твердом носителе:

* согласно нормативным документам, в этом случае клиническая симптоматика имеет приоритет при вынесении диагноза, как это и было до 01.07.2008, тест, проведенный сотрудником ДПС, считается предварительным и не имеет юридической силы; * водитель доставляется в кабинет медицинского освидетельствования (или на мобильный пункт медицинского освидетельствования), далее — как указано выше (обязательно производится анализ выдыхаемого воздуха с помощью как минимум двух различных средств индикации или приборов для скрининговых исследований).

Программное обеспечение приборов Lion Intoxilyzer 8000 и АКПЭ-01 позволяет отбраковывать результаты при наличии абсорбированного алкоголя (скорость увеличения концентрации этанола в пробе воздуха значительно выше при наличии алкоголя в ротовой полости), однако в РФ использование этой функции не предусмотрено и тест обязательно повторяют через 20 мин.

Следует иметь в виду, что большинство используемых приборов (см. табл. 7-5), кроме Lion Intoxilyzer 8000 и АКПЭ-01, не имеет функции «анализ калибровочной смеси» (см. табл. 7-7). Поэтому на распечатке указаны даты последней поверки и калибровки (не всегда), а гарантией проведения этих мероприятий служит свидетельство о проверке.

Если при освидетельствовании используются разные биосредыПри медицинском освидетельствовании используют венозную кровь. Различие концентрации этанола в венозной крови при прямом определении и при пересчете результатов анализа выдыхаемого воздуха в фазе элиминации может быть более 100%., то результатЕсли освидетельствование происходит на фоне резорбции этанола, то преимущество получают лица, у которых отбирается на анализ кровь, если на фоне элиминации — те, у которых анализируется выдыхаемый воздух. определения этанола (следовательно, и диагноз «опьянение») будет зависеть:

* от биопробы исследования (выдыхаемый воздух или кровь из вены); * периода кинетической фазы, в течение которого проходит отбор биопробы.

В большинстве стран на законодательном уровне принят коэффициент пропорциональности (коэффициент пересчета), поэтому применение концентрации, выраженной в единицах концентрации в крови с точки зрения

закона точно соответствует концентрации, выраженной в единицах концентрации в выдыхаемом воздухе.

В России, согласно международной Конвенции о дорожном движении, коэффициент пропорциональности, или коэффициент пересчета, равный **2000:1** (ранее он составлял 2200:1), принят de facto в июле 2008 г. (в законе не прописан), потому что соотношение между двумя *принятыми нормами* — **0,3 г / л крови и 0,15 мг / л выдыхаемого воздуха.**

7.2. Органические соединения, относящиеся к группе летучих ядов

Кто неуклюжей рукой хватает розу,
Пусть не жалуется, что шипы ее ранят.

Генрих Гейне (1797–1856), выдающийся
немецкий поэт, публицист, критик

Классификация. Физико-химические и токсикологические характеристики

Летучие органические соединения находят широкое применение в качестве растворителей, антифризов, горючих материалов, сырья для получения самых разнообразных продуктов, которые широко используются в производстве, лабораториях и быту. Многие из них высокотоксичны, при определенных условиях могут вызвать как острые, так и хронические отравления, носящие профессиональный характер или возникающие вследствие нарушений правил техники безопасности. Возможны и бытовые отравления — прием технических жидкостей внутрь по ошибке или преднамеренно, нередко с целью опьянения. Наиболее часто встречаются и тяжело протекают острые отравления этиленгликолем и его производными, хлорированными углеводородами (дихлорэтан, четыреххлористый углерод, трихлорэтилен), метиловым спиртом, средними и высшими спиртами. Отравление может быть вызвано пероральным приемом суррогатов этилового алкоголя.

К *летучим токсичным веществам* (летучим ядам) относят соединения различных химических классов. В обязательный минимум химико-токсикологического исследования включены следующие группы веществ (приказ МЗ РФ № 9 от 08.01.2002):

* этиловый, метиловый и другие алифатические спирты; * хлорированные углеводороды (хлороформ, четыреххлористый углерод, трихлорэтилен, дихлорэтан, перхлорэтилен); * ароматические углеводороды (бензол, толуол), диэтиловый эфир, ацетон, этилацетат.

В первый раздел Перечня токсикологически важных веществ, подлежащих судебно-химическому исследованию в лабораториях бюро судебно-медицинской экспертизы (далее Перечень) включены:

* синильная кислота и ее соединения (см. п. 7.3); * метиловый, этиловый, пропиловый, бутиловый и амиловый спирты; * формальдегид; * хлороформ, хлоралгидрат, четыреххлористый углерод, дихлорэтан; * фенол, крезолы.

На эти соединения проводят исследования при общем СХА.

Во второй раздел Перечня включены вещества, необходимость поиска которых возникает в зависимости от клинической и секционной картины, результатов гистологического и гистохимического исследования, особенностей течения химических реакций при химико-токсикологическом анализе и т.д.:

* тетраэтилсвинец; * этиленгликоль; * ацетон; * нитро- и динитробензолы, анилин; * бензол, толуол, ксилол, бензин, керосин.

В табл. 7-8 перечислены некоторые представители токсикантов, относящихся к группе летучих ядов.

Таблица 7-8. Токсиканты группы летучих ядов

Класс соединений	**Представители**
Алифатические углеводороды	Бензин, керосин

Галогенопроизводные алифатических углеводородов	Хлороформ, четыреххлористый углерод, дихлорэтан, трихлорэтилен и др.
Алифатические спирты	Метанол, этанол (см. п. 7.1), пропанол и др.
Двухатомные спирты и их эфиры	Этиленгликоль и его эфиры
Простые и сложные эфиры	Диэтиловый эфир, этилацетат и др.
Альдегиды и кетоны	Формальдегид, ацетон и др.
Карбоновые кислоты	Муравьиная, уксусная
Ароматические углеводороды и их производные	Бензол, ксилол, нитробензол и др.
Фенолы и их производные	Фенол, крезол
Неорганические кислоты и их производные	Синильная кислота и ацетонитрил
Другие	Тетраэтилсвинец

В клинической токсикологии часто используют термин «*суррогаты алкоголя*». Суррогаты алкоголя подразделяют на *две группы*:

* растворы и препараты, приготовленные на основе этилового спирта, содержащие различные примеси; * технические жидкости, растворы и препараты, не содержащие этиловый спирт, в состав которых входят алифатические одноатомные и многоатомные спирты, хлорорганические углеводороды (ложные суррогаты алкоголя).

К первой группе относят:

* спирты синтетические, полученные прямой гидратацией этилена или его гидратацией с применением серной кислоты, и спирты ферментативные, полученные путем сбраживания непищевого растительного сырья (см. п. 7.1); * денатурат — этанол, содержащий метиловый спирт, альдегиды и другие примеси; * одеколоны, лосьоны, другие подобные средства с содержанием этанола до 60%, в рецептуру которых включены также эфирные масла и прочие примеси; * синтетические клеи, содержащие различные смолы, растворенные в этаноле, ацетоне, толуоле, этилацетате и т.д.; * политуру — технический спирт с содержанием ацетона, бутилового и амилового спиртов; * нигрозин — морилку для дерева, содержащую этиловый спирт и красящие вещества, вызывающие интенсивное и длительное окрашивание кожных покровов и слизистых оболочек в синий цвет.

К техническим жидкостям, содержащим суррогаты второй группы (ложные суррогаты алкоголя), относят тормозные жидкости БСК и АСК (красного цвета), содержащие соответственно бутиловый и амиловый спирты (а также касторовое масло). Отравления «средними» спиртами напоминают картину острой алкогольной интоксикации. Токсичность этих спиртов неодинакова. Наименее токсичны пропиловые, наиболее — амиловые спирты, а бутиловые занимают промежуточное положение. Отравления происходят преимущественно при приеме внутрь. Пропанол и его изомеры быстро метаболизируются в организме, амиловые спирты — медленно. В результате метаболизма первичных спиртов образуются соответствующие альдегиды и кислоты. Летучие токсиканты и их метаболиты удаляются с выдыхаемым воздухом и мочой.

По терминологии, предложенной Международной ассоциацией судебных токсикологов (TIAFT), эта группа веществ называется volatile substance abuse — VSA (дословно: злоупотребление летучими веществами). В бюллетене TIAFT приведены сведения о более чем 1000 таких соединений.

Летучие вещества могут легко проникать в организм человека ингаляционно. Частично они проникают через кожу и попадают с потоком крови в органы и ткани. При оральном приеме летучие вещества, всасываясь из ЖКТ, проникают в ткани даже после смерти.

В случаях острого отравления симптомы появляются на ранних этапах воздействия. Летучие яды быстро проникают в мозг, ткани которого богаты липидами. Начальные симптомы возникают от наркотического воздействия на ЦНС, в дальнейшем токсические эффекты проявляются головокружением, дезориентацией, параличом вкусовых сосочков языка, галлюцинациями, потерей сознания и судорогами. Смерть наступает внезапно, часто от остановки сердца. Неоправданная потеря времени, недостаточность медицинских мероприятий, неправильная

или несвоевременная эвакуация из очага поражения могут нанести непоправимый вред организму, способствовать летальному исходу или развитию необратимых последствий. *Категорически запрещается* оставлять для лечения *в домашних* условиях пострадавших *даже с легкими формами отравления техническими жидкостями* или с подозрением на вероятную интоксикацию. При остром отравлении парами летучих ядов пострадавшему необходимо обеспечить доступ к свежему воздуху, сделать искусственное дыхание. При пероральном приеме токсикантов необходимо срочно провести промывание желудка. В любом случае пострадавший должен быть доставлен в специализированное медицинское учреждение как можно быстрее. При проведении судебно-химического исследования на летучие яды необходимо учитывать применяемые для спасения пострадавшего способы детоксикации.

Определение концентрации летучих ядов в крови важно для установления тяжести отравления. При разработке методик обнаружения и количественного определения летучих ядов учитывают данные о токсичности конкретного вещества. Пределы обнаружения методов исследования должны быть ниже токсических концентраций, только в этом случае химическая реакция или другой результат определения будет иметь отрицательное химико-токсикологическое (судебно-химическое) значение.

Чтобы сделать оптимальный выбор объектов, подлежащих химико-токсикологическому исследованию, наряду с токсикологической характеристикой, необходимо знать возможные пути поступления и биотрансформации летучих ядов (табл. 7-9).

Таблица 7-9. Основные метаболиты летучих ядов

Вещество	**Основные метаболиты, % абсорбированной дозы**	**Примечание**
1,1,1-Трихлорэтан	2,2,2-Трихлорэтанол до 2%, трихлоруксусная кислота до 0,5%	—
Пропанол-2	Ацетон до 80–90%	*T*~½ ~2-пропанола около 2 ч, ацетона — до 22 ч
Ацетон	Выводится в основном в неизмененном виде и в виде пропанола-2 (небольшое количество)	Образуется в большом количестве в организме больных диабетом и кетоацидозом; является основным метаболитом пропанола-2
Ацетонитрил	До 12% присутствует как цианид-ион, переходящий затем в тиоцианид-ион	При длительном поглощении паров ацетонитрила цианид- и тиоцианид-ионы накапливаются
Бензол	Фенол 51–87%, катехол до 6%, гидрохинон и *транс*-муконовая кислота до 2%	В моче обнаруживается в виде конъюгатов фенола с серной или глюкуроновой кислотой. Присутствие в моче фенола может служить индикатором отравления бензолом, однако при этом наблюдаются значительные флуктуации, связанные с индивидуальными особенностями организма
Бромометан	Бромиды	Концентрацию бромид-иона в плазме крови используют для мониторинга состояния отравления. Эти концентрации значительно ниже, чем при приеме бромистоводородных солей перорально
Бутан	Бутанол-2 и бутанон, каждого не более 1%	При летальном исходе исследуется жировая ткань. Определение карбоксигемоглобина используют для индикации хронического отравления природным газом
Бутанон (метилэтилкетон)	3-Гидроксибутанон в моче не более 0,1%	Бóльшая часть вещества выводится в неизмененном виде с выдыхаемым воздухом
Галотан Фторотан	Хлортрифторэтан, хлордифтороэтилен,	Образование свободных радикалов может служить причиной гепатокосичности этих средств для наркоза

	трифторуксусная кислота, бромид-ион и др.	
Гексан	Гексанол-2, гексанон-2, гександион-2,5	Гексанол-2 выводится с мочой в виде глюкуронида. Считается, что гександион-2,5 определяет гепатоксичность гексана, а гексанон-2 — его нейротоксичность. В дальнейшем последний метаболизируется в гександион-2,5
Диметилсульфоксид	Диметилсульфид до 3%, диметилсульфон до 18–22%	Легко проникает через кожные покровы. После перорального или перкутанного проникновения выделяется с выдыхаемым воздухом как диметилсульфид и с мочой как диметилсульфон
Диоксан	β-Гидроксиэтоксиуксусная кислота (ГЭУК)	ГЭУК выводится с мочой
Дихлорметан	Монооксид углерода до 50%	При атмосферном давлении в выдыхаемом воздухе $T_{1/2}$ ~моноксида углерода около 13 ч. Определение карбоксигемоглобина используется для индикации хронического отравления
Изобутан	2-Метил-пропанол-2 в незначительном количестве	см. Бутан
Изобутилнитрит	2-Метил-пропанол-1 до 99% и нитрит-ион	Это вещество не детектируется в плазме крови. Индикатором отравления служит концентрация метгемоглобина
Изопентилнитрит	3-Метил-бутанол-1 до 99% и нитрит-ион	Это вещество не детектируется в плазме крови. Индикатором отравления служит концентрация метгемоглобина
Ксилены	Толуоловые кислоты до 95%, ксиленолы до 2%	Конъюгаты толуоловых кислот с глицином и выведение метилгиппуровой кислоты — индикатор выведения токсиканта
Метанол	Формальдегид до 60%, муравьиная кислота	Отравление метанолом отслеживается по концентрации муравьиной кислоты в моче
Пропан	Пропанол-2, ацетон, каждого менее 1%	см. Бутан
Стирен	Амигдалиновая кислота до 85%, фенилглиоксиловая кислота до 10%	Выведение токсиканта контролируется по содержанию амигдалиновой кислоты в моче. Этанол ингибирует ее выведение
Тетрахлорэтилен	Трихлоруксусная кислота менее 3%	Выведение трихлоруксусной кислоты является индикатором отравления
Толуол	Бензойная кислота до 80% и изомеры крезола до 1%	В моче бензойная кислота присутствует в виде конъюгата с глицином
Трихлорэтилен	2,2,2-Трихлорэтанол до 45%, трихлоруксусная кислота 32%	$T_{1/2}$~ глюкуронида трихлорэтанола и трихлоруксусной кислоты 12 и 100 ч соответственно
Хлороформ	Диоксид углерода 50%, диглутатионил дитиокарбонат	Высокая гепатотоксичность связана с образованием трихлорометильных свободных радикалов, фосгена и тиофосгена
Циклогексанон	Как циклогексанол до 50%	Циклогексанол в моче присутствует в виде конъюгата с глюкуроновой кислотой
Четыреххлористый углерод	Хлороформ, диоксид углерода, гексахлорэтан и др.	Чрезвычайно высокая гепатотоксичность связана с образованием трихлорометильных свободных радикалов, фосгена и тиофосгена
Энфлуран	Дифторометоксидифтороуксусная кислота до 2,5%, фторид-ион	—
Этилацетат	Этанол, уксусная кислота	Метаболизм проходит быстро за счет действия эстераз плазмы крови

Этилбензол	Метилфенилкарбинол до 5%, амигдалиновая кислота до 64%, фенилглиоксиловая кислота до 25%	Из перечисленных метаболитов в моче только метилфенилкарбинол присутствует виде конъюгата, остальные — в виде свободных кислот. Мониторинг тяжести отравления осуществляют по концентрации амигдалиновой кислоты

Особенности пробоподготовки

Объекты исследования при подозрении на отравление летучими токсикантами изымаются в соответствии с учетом особенностей токсикокинетики анализируемых веществ в соответствии с нормативными документами.

Объектами исследования при ХТА на летучие яды являются кровь, моча и промывные воды, внутренние органы, а также вещественные доказательства — технические жидкости.

Кровь отбирают пункцией кубитальной вены в сухой стерильный флакон емкостью 10–15 мл под пробку с 1–2 каплями раствора гепарина. Флакон тотчас герметично закрывают силиконовой пробкой и содержимое перемешивают. При проведении операций гемосорбции (гемодиализа) кровь отбирают в сухие стерильные флаконы до и после пропускания через колонки.

Мочу отбирают в сухие стерильные флаконы и тотчас закрывают пробкой.

Обязательно *одномоментное взятие крови и мочи*, интервал не должен превышать 5–10 мин. Кровь и мочу отбирают в экстренном порядке, так как большинство летучих ядов очень быстро выводятся легкими.

Перитонеальную жидкость отбирают после ее полной эвакуации из полости и измерения объема в сухой флакон под пробку и герметично закрывают.

Сальник и *жировую клетчатку* отбирают в особых случаях при проведении перитонеального диализа. В предварительно взвешенный флакон помещают 1–3 г иссеченной ткани, флакон взвешивают и укупоривают.

Раздельно отбирают первую и последнюю порции промывных вод.

Технические жидкости и другие вещественные доказательства доставляют на исследование в оригинальной упаковке или отбирают во флаконы и тщательно укупоривают.

На все флаконы наклеивают стандартные этикетки с указанием фамилии, имени и отчества больного, номера истории болезни, времени взятия пробы. Все объекты до начала исследования хранятся в холодильнике, *замораживание не допускается*. Флаконы откупориваются непосредственно перед исследованием.

При проведении СХА в соответствии с приказом МЗ РФ № 161 от 24.04.2003 отбирают следующие пробы при подозрении на отравление:

* этанолом — кровь и мочу по 10–20 мл (в посуду, заполненную под пробку). Кровь берут пипеткой или шприцем из крупных вен конечностей или синусов твердой мозговой оболочки. При невозможности взять пробы крови и мочи берут мышечную ткань (около 10–20 г) и почку; * летучими хлорорганическими веществами — часть сальника 200 г, головной мозг и печень по 100 г, почку, кровь и мочу по 10–20 мл; * метиловым спиртом — головной мозг и печень по 100 г, почку, кровь и мочу по 10–20 мл.

Банки герметично закрывают, наклеивают этикетки с необходимыми записями и помещают в опечатанный полиэтиленовый пакет, который немедленно пересылают для исследования.

Экспериментальные исследования на животных показали, что применение формалина для консервирования внутренних органов трупа не влияет на сохранность диэтилового эфира, хлороформа, этанола, толуола и не мешает их определению, но консервант обычно не добавляют.

Для исключения загрязнения вещественные доказательства — технические жидкости, растворители, ингаляционные анестетики, вызвавшие отравление, а также образец консерванта в случае его применения — должны упаковываться, транспортироваться и храниться отдельно от биологических образцов.

Ранее повсеместно для изолирования летучих токсичных веществ применяли *различные типы дистилляции* (перегонки), в настоящее время эти способы утрачивают свое значение, так как основным методом определения летучих токсикантов является *ГХ.*

Типы дистилляции

* Метод перегонки с водяным паромЗначительное количество летучих токсикантов легко перегоняется с водяным паром, за исключением веществ, имеющих высокую температуру кипения и не образующих с водой азеотропных смесей: этиленгликоль (t~кип ~— 197,4 °С), уксусная кислота (t~кип ~— 118,5 °С), тетраэтилсвинец (t~кип ~— 195 °С) и некоторые другие.. * Микроотгонка — еще один способ подготовки пробы для проведения газохроматографического определения. Количество объекта 5 г. Собирается 2 мл дистиллята. * Перегонка с водяным паром с одновременной продувкой азотом — частный метод, который используют для изолирования из биообразцов синильной кислоты и ее солей (см. п. 7.3), которые согласно принятой в токсикологической химии классификации относят к группе летучих ядов. Проводится в приборе для перегонки с водяным паром. В пробке, которая закрывает перегонную колбу, делают дополнительное отверстие для подачи тока азота. Дистиллят собирают в приемник, содержащий 5 мл 0,1 н гидроксида натрия. Указанным способом изолируются до 62,90–88,05% синильной кислоты при содержании 50–1000 мкг в 100 г органа. Изолирование можно проводит как из свежего, так и из загнившего трупного материала. * Дистилляция (простая перегонка) используется для веществ с низкой температурой кипения: ацетона, этанола, метанола и др. Недостатком метода является неполная отгонка анализируемых веществ. * Азеотропная перегонка. При азеотропной перегонке температура кипения азеотропной смеси ниже, чем температура кипения самого низкокипящего компонента. * Экстракционный метод применяют при изолировании некоторых высококипящих летучих ядов. Так, при исследовании свежего трупного материала используют экстракцию этиленгликоля бензолом из печени и желудка с содержимым. * Метод микродиффузии. Модифицированные камеры Конвея используют для изолирования синильной кислоты (см. п. 7.3). Дистиллят собирают в 2 мл 0,1 н гидроксида натрия, который помещают в центральное углубление модифицированной камеры Конвея (внутренняя камера). Диаметр внутренней камеры 3 см, диаметр внешней камеры 6 см. Во внешнюю камеру добавляют
 4 мл крови или мочи, 2 мл 10% раствора серной или винной кислоты и тщательно перемешивают. Камеру закрывают завинчивающейся крышкой, помещают на 1 ч в термостат (50 °С). После охлаждения из центрального углубления камеры отбирают 1 мл жидкости для количественного определения синильной кислоты. Оставшуюся жидкость исследуют химическим методом. При содержании 50–1000 мкг синильной кислоты в 100 мл крови определяется 86,00–98,10%, в моче — 92,80–99,10%.

Большинство методик *газохроматографического* определения летучих веществ основано на *анализе равновесной паровой фазы*, которые отличаются *по способу введения* анализируемой пробы в хроматограф (см. п. 7.1).

Анализ равновесной паровой фазы имеет ряд преимуществ:

* исключены трудоемкие операции пробоподготовки (экстракция, перегонка, перегонка с водяным паром и т. п.), * исключены перегрузка или загрязнение хроматографической колонки водой, высококипящими или нелетучими веществами, что неизбежно при непосредственном вводе в колонку анализируемой пробы в жидком виде.

Мелкоизмельченные навески внутренних органов, биологические жидкости (кровь, моча, ликвор и др.) помещают в герметичную емкость, через определенное время устанавливается термодинамическое равновесие летучих компонентов в паровой фазе. С помощью дозирующего устройства часть паровой фазы отбирают и вводят в анализатор. Равновесную паровую фазу отбирают с помощью газоплотного шприца. Используют ручной способ или автоматический с помощью автосамплера. При ручном способе флакон с пробой подогревают в термобане.

Статический парофазный пробоотборник. С помощью системы электронного контроля давления газа-носителя оптимизируется процесс переноса пробы из статического парофазного пробоотборника в газовый хроматограф и условия проведения анализа — давление во флаконе с анализируемым образцом, деление потоков газа.

Динамический парофазный пробоотборник (Purge and Trap). Сорбционное концентрирование образцов из газовой фазы с помощью динамического пробоотборника Purge and Trap дает возможность анализировать ультранизкие концентрации летучих органических веществ. При пробоподготовке достигаются высокая степень очистки

и эффективность извлечения летучих веществ из биологических жидкостей. Инертный газ пропускают через образец, а пары летучего соединения концентрируются в ловушке с адсорбентом (активированный уголь, силикагель, полимерные сорбенты — полисорб, Tenax). Для последующего определения сконцентрированные вещества десорбируются с носителя путем быстрого нагревания ловушки с адсорбентом до высокой температуры и потоком гелия через капилляр вводятся в испаритель газового хроматографа. Эффективность выделения летучих веществ при использовании этого метода достигает 97%, а в сочетании с газохроматографическим разделением на капиллярной колонке и масс-селективным детектированием идентифицируют любые летучие вещества на уровне фоновых концентраций в биологических жидкостях, питьевой воде, атмосферном воздухе, воздухе производственных помещений и рабочей зоны.

Метод прямого ввода пробы в хроматограф. При использовании метода прямого ввода на стадии пробоподготовки объектов биологического происхождения применяют различные способы, позволяющие предотвратить загрязнение хроматографической колонки. При прямом введении в испаритель хроматографа непосредственно цельной крови происходит ее спекание в микрошприце в результате термокоагуляции. После депротеинизирования вольфраматом натрия и серной кислотой возможен прямой ввод биологических жидкостей в испаритель с высокой температурой. Хорошие результаты получают при использовании технических возможностей современных хроматографов — испарителя, оборудованного системой охлаждения и программирования температуры, системы переключения потока газа-носителя на сброс через несколько минут после ввода пробы с одновременным резким повышением температуры испарителя. При этом используют легко сменяемые предколонки — специальные вставки в испаритель (лайнеры), заполненные различными сорбентами, которые работают в качестве защитных фильтров от малолетучих компонентов биологических жидкостей. Это дает возможность повысить предел обнаружения за счет уменьшения фона хроматограммы.

Метод прямого ввода в основном применяют при анализе *малолетучих* токсичных веществ, в частности *гликолей и их высококипящих эфиров*. Так, при направленном анализе на этиленгликоль и диэтиленгликоль мочу предварительно центрифугируют, а затем пропускают через патрон для ТФЭ Evidex SPE C18 для дополнительной очистки от компонентов органической и неорганической природы.

Методы определения

Скрининг на летучие токсичные вещества

Схема скрининга на летучие токсичные вещества, подлежащие судебно-химическому исследованию в лабораториях БСМЭ, регламентируется Перечнем (см. выше). При проведении ХТА используют и газохроматографический, и химический методы, однако последний малоспецифичен, в настоящее время применяется редко.

Скрининг методом ГЖХ. Скрининг методом ГЖХ проводится на двух колонках с неподвижными жидкими фазами различной полярности по относительному времени удерживания или индексам удерживания Ковача по *унифицированной методике,* которая основана на применении фазовых равновесий летучих веществ вне хроматографической колонки — анализа равновесной паровой фазы (см. выше). При исследовании биообразца на содержание многокомпонентных смесей органических растворителей, бензина, керосина проводят идентификацию по их основным компонентам путем наложения (сравнения) хроматограмм исследуемых объектов и стандартов.

Условия газохроматографического разделения. Как один из вариантов исследование выполняют на газовом хроматографе с ПИД. Скорость потока газа-носителя гелия 24 мл / мин, водорода 27 мл / мин, воздуха 270 мл / мин. Колонки металлические, 100×0,3 см. Температура термостата колонок 82 °С, испарителя 100 °С. Колонка заполнена сорбентом — целитом С-22 (60–80 меш), модифицированным слоем металлического серебра. Неподвижные жидкие фазы: 10% 1,2,3-три- (β-циан-этокси) пропан и 10% тритон Х-100.

Методика исследования. В два стеклянных флакона (15 мл), содержащих по 1 мл раствора фосфорновольфрамовой кислоты, помещают по 1 мл внутреннего стандарта (2-хлорбутана) и по 1 мл исследуемой пробы. После перемешивания во флаконы вносят по 2,5 г безводного сульфата натрия, флаконы закрывают резиновыми пробками и фиксируют алюминиевыми колпачками. Флаконы помещают на кипящую водяную баню

на 5 мин. Затем прокалывают пробку шприцем и отбирают 0,5 мл парогазовой фазы и вводят в хроматограф. Измеряют время удерживания наблюдаемых на хроматограммах пиков в двух параллельных исследованиях, рассчитывают параметры удерживания — относительное время (объем) удерживания или индексы удерживания Ковача (см. п. 5.3).

Мешающее влияние и границы обнаружения

Обнаружению и определению хлороформа, четыреххлористого углерода, дихлорэтана, хлоралгидрата, ацетона, алифатических спиртов, бензола, толуола, *орто*- и *мета*-ксилолов не мешает их совместное присутствие, а также присутствие таких веществ, как метилэтилкетон, формальдегид, ацетальдегид, диэтиловый эфир, метил-, этил-, бутил- и амилацетаты, циклогексанон, метиленхлорид, перхлорэтилен, хлорбензол, гексан, гептан, циклогексан, касторовое и минеральное масло.

Вещества, образующиеся при гниении биоматериала, могут мешать определению. Так, в гнилостно-измененной крови *н*-пропиловый спирт образуется как один из продуктов микробиологической деструкции органических веществ. В этом случае в качестве внутреннего стандарта целесообразно использовать другое вещество, например метиловый спирт, не образующийся в значимых количествах в процессе гниения внутренних органов и крови.

Границы обнаружения производных углеводородов в биоматериале приведены в табл. 7-10.

Таблица 7-10. Границы обнаружения хлорпроизводных алифатических углеводородов и ароматических углеводородов в биоматериале

Вещество	**Граница газохроматографического обнаружения**		**Чувствительность химической реакции, мг / 100 г органа или мг / 100 мл биологической жидкости**
	мг на 2 мл крови	**мг на 5 г печени**	
Хлороформ	0,01	0,025	0,01∗ (0,2)
Четыреххлористый углерод	0,05	0,15	2,3∗ (6,8)
Дихлорэтан	0,025	0,05	— (2,5)
Хлоралгидрат	—	0,025	0,01∗ (0,15)
Трихлорэтилен	0,025	0,05	— (—)
Бензол	—	0,001	0,08∗∗ (—)
Толуол	—	0,002	0,1∗∗ (—)
м-Ксилол	—	0,01	0,6∗∗ (—)

∗ Чувствительность реакции образования изонитрила (в скобках — чувствительность реакции замещения хлорида).

∗∗ Чувствительность реакции нитрования ароматических соединений (определена при экспериментальном исследовании).

При газохроматографическом исследовании с ПИД (см. п. 5.3) идентификацию веществ проводят по параметрам удерживания. В большинстве современных методик при этом используется программа фиксации времени удерживания (RTL — Retention Time Locking), что позволяет унифицировать методику анализа в различных лабораториях.

Методика RTL дает возможность производить настройку хроматографической системы таким образом, что время удерживания анализируемых соединений остается неизмененным при замене хроматографической колонки, а также при использовании методики на аналогичном оборудовании в других лабораториях.

Подтверждающие исследования проводят методом ГХ-МС или используют качественные химические реакции.

При проведении исследования методом ГХ-МС (см. п. 5.3) идентификацию обнаруженных летучих веществ проводят по параметрам удерживания и их МС (используют библиотеки МС Pfeger, NIST, WiLey). Масс-спектрометрическое детектирование выполняется в режиме полного сканирования (SCAN), регистрируемые МС

идентифицируют по библиотеке МС. При совпадении МС и времени удерживания анализируемого вещества и вещества сравнения идентификацию считают достоверной.

Режим селективной регистрации по выбранным ионам (SIM) проводят для повышения чувствительности определения. При этом идентификацию вещества проводят по времени удерживания и отношению интенсивностей регистрируемых ионов.

Количество летучего вещества в паровой фазе при газохроматографическом определении измеряется площадью его пика *F* и рассчитывается по формуле (закон Рауля)

$F = \gamma \cdot c \cdot p\sim o\sim \cdot x = k \cdot x$,

где γ — коэффициент активности растворенного компонента; *c* — константа, зависящая от характеристик применяемого детектора; *p*~o ~— давление пара чистого компонента; *x* — мольная доля летучего компонента, растворенного в анализируемой пробе.

Коэффициент активности γ зависит не только от природы летучего компонента и других компонентов смеси, мольной доли всех компонентов, но и от температуры и давления (если давление в замкнутом объеме превышает 2 атм).

При количественном газохроматографическом анализе равновесной паровой фазы необходимо найти коэффициент *k* прямыми измерениями (при калибровке хроматографа с помощью стандартных образцов). При этих же условиях проводится исследование экспертных биообъектов и/ или других вещественных доказательств, доставленных с места происшествия. Результаты количественного определения токсикантов *методами ГХ-ПИД и ГХ-МС* получают путем *автоматического расчета* по площади пика (базового иона — ГХ-МС) с учетом коэффициента относительной чувствительности по отношению к внутреннему стандарту. Оперативный контроль погрешности определения и контроль качества измерений (Quality Control — QC) проводят, используя стандартные смеси. *Погрешность* определения для метода *ГХ-МС* не превышает 5 и 2% на уровне определяемых концентраций *0,005–0,5 и 0,5–1000 мг* / *мл* соответственно. Для метода *ГХ-ПИД погрешность* определения не превышает 5 и 2% на уровне определяемых концентраций *0,5–5 и 5–1000 мг / мл* соответственно. Контроль фона, в результате которого могут быть выявлены ложноположительные результаты, выполняют, анализируя биологические жидкости, не содержащие определяемых веществ. Оперативный контроль сходимости и отсутствия ложноположительных результатов проводится ежедневно перед исследованием экспертных образцов.

По согласованию с судебно-медицинскими экспертами исследования на формальдегид, синильную кислоту и ее соединения, фенолы, крезолы, а также токсиканты из второго раздела Перечня — этиленгликоль, нитро- и динитробензолы, анилин, тетраэтилсвинец проводятся *при специальном задании* с помощью *других методик*.

Малолетучие соединения этиленгликоль, диэтиленгликоль и близкие им по летучести вещества анализируют *прямым вводом* биожидкости в хроматограф. В табл. 7-11 приведены хроматографические параметры удерживания и МС некоторых малолетучих компонентов технических жидкостей.

Таблица 7-11. Хроматографические параметры удерживания и масс-спектры некоторых малолетучих компонентов технических жидкостей

Вещество	Молекулярная масса, а. е. м.	Время удерживания, мин	МС (в скобках — интенсивность, % базового пика, базовый пик — 100)
Циклогексанол	100,1	11,52	99 (2,6), 82 (42,7), 73 (16,2), 67 (48,8), 57 (100), 41 (46,3)
1,2-Бутиленгликоль	90	13,97	91 (9,3), 73 (100), 55 (13), 45 (69)
Пропиленгликоль	76	14,21	77 (5,5), 59 (42), 45 (100)
Этиленгликоль	62	14,74	63 (58), 45 (100)
Диэтиленгликоль	106	19,72	107 (3), 89 (5), 75 (6)

Фенол	94,1	20,37	94 (100), 66 (47)
Тимол	150,2	24,39	150 (25), 135 (100), 117 (10), 115 (10), 91 (15)

7.3. Ядовитые газы

Мысль никогда не должна подчиняться ни догме, ни направлению, ни страсти, ни интересу, ни предвзятой идее, ни чему бы то ни было, кроме фактов, потому что для нее подчиниться — значило бы перестать существовать.

Анри Пуанкаре (1854–1912), знаменитый
французский математик, физик, механик, астроном, философ,
глава Парижской АН (1906) и член еще 39 академий наук мира,
в том числе Петербургской АН

7.3.1. Оксид углерода(II)

Из ядовитых газообразных веществ особый токсикологический и судебно-медицинский интерес представляет CO — оксид углерода(II). *Долгосрочные последствия* отравления угарным газом нередко приводят к летальному исходу, который, возможно, связан с тем, что угарный газ повреждает белок миелин, входящий в состав оболочки нервных клеток. В ответ на отравление CO в организме начинается синтез специализированных лимфоцитов, которые выводят поврежденный белок из организма. Однако с удалением измененных молекул миелина одновременно повреждаются и нормальные молекулы и тем самым запускается цепная аутоиммунная реакция.

Оксид углерода(II) — бесцветный газ без запаха и вкуса. В воде почти не растворяется, горит синеватым пламенем с образованием оксида углерода(IV) и выделением тепла.

Острые отравления CO занимают ведущее место среди ингаляционных отравлений, летальные исходы составляют 12,5% общего количества всех смертельных отравлений.

Источники CO. Оксид углерода(II) встречается везде, где существуют условия для неполного сгорания веществ, содержащих углерод, входит в состав многих промышленных газов (доменный, генераторный, коксовый); широко применяется в современном органическом синтезе.

Важными источниками CO являются выхлопные газы автомобилей (содержат 1–13%), дым от пожара и неверно эксплуатируемые нагревательные системы. Пары дихлорметана (содержится в детергентах и аэрозолях), в результате биотрансформации которого неспецифическими оксидазами образуются угарный и углекислый газы, также могут приводить к отравлению CO.

Механизм токсического действия CO обусловлен образованием *карбоксигемоглобина* — HbCO (см. п. 1.4).

При острых отравлениях CO связывается преимущественно железом гемоглобина эритроцитов. При повторных или хронических отравлениях в плазме крови увеличивается количество негемоглобинового железа за счет выхода его из тканей. Это железо также фиксирует поступающий CO.

При действии даже весьма низких концентраций CO его присутствие обнаруживают в различных тканях организма, так как CO фиксируется имеющимися в них железосодержащими ферментами, а в мышцах — еще и железом миоглобина (при этом образуется карбоксимиоглобин — MbCO). Кроме того, присутствие CO в тканях связано с наличием в них крови, содержащей CO. По сравнению с гемоглобином сродство миоглобина к CO и O~2 ~приблизительно в 5 раз меньше.

При отравлениях CO нарушается *углеводный обмен*. Увеличение уровня сахара в крови начинается с первых минут интоксикации и нарастает параллельно гипоксемии. Установлено, что эти изменения обусловлены нарушением центральной регуляции углеводного обмена под воздействием CO, что связано с усилением распада гликогена или нарушением утилизации глюкозы. Усиленный гликогенолиз приводит к развитию гипергликемии. Повышение содержания глюкозы отмечается не только в крови, но и в ткани мозга. Установлена зависимость между тяжестью интоксикации угарным газом и содержанием глюкозы в мозге.

Токсикокинетика и биотрансформация

Единственным путем поступления в организм CO являются дыхательные пути. Токсический эффект для человека наблюдается при вдыхании воздуха с концентрацией CO 3·10^–3^ г / л в течение 1 ч.

На распределение CO между кровью и мышцами влияют концентрация CO во вдыхаемом воздухе и продолжительность контакта. При смертельном отравлении у людей и содержании в крови 58–85% HbCO в скелетных мышцах было обнаружено 10–53%, в миокарде — 3–44% MbCO.

Концентрация MbCO в мышцах всегда значительно ниже концентрации HbCO в крови. Сопоставление концентраций HbCO и MbCO может помочь в установлении динамики отравления. Для определения коэффициента корреляции между количеством HbCO и MbCO требуются дополнительные наблюдения и специальные исследования.

Выводится CO из организма в основном через дыхательные пути в течение нескольких часов. После прекращения вдыхания 60–70% CO выделяется у человека в течение 1-го часа; за 4 ч выделение составит 96% абсорбированной организмом дозы. В ничтожном количестве монооксид углерода выделяется через кожу — около 0,007 мл / ч, несколько больше — через ЖКТ и почки, с мочой CO выводится в виде комплексного соединения с железом.

Методы определения

Лабораторная диагностика отравлений монооксидом углерода заключается в определении HbCO в крови. В то же время содержание HbCO в крови, которое определяется при поступлении больного в стационар, *не может служить надежным критерием* установления тяжести состояния больных. В большинстве случаев оно бывает очень низким, в то время как клиническая симптоматика свидетельствует о тяжелой степени отравления. Подобное несоответствие можно объяснить тем, что со временем и/ или при оказании пострадавшему первой помощи происходит диссоциация HbCO, частичная элиминация угарного газа и снижается содержание HbCO в крови, поэтому большее диагностическое значение имеет его определение в крови, взятой непосредственно *на месте происшествия*.

Для определения CO в крови можно использовать различные методы, включая предварительные пробы, спектрофотометрию, ГХ и специальные методы. Определение CO в крови проводят либо непосредственно по CO, либо выделяют из пробы крови смесь газов (CO, CO~2~, O~2~, N~2~), измеряют количество смеси и тем или иным способом устанавливают содержание в ней CO.

Предварительные методы исследования (химические). При выполнении реакций параллельно исследуют два образца:

* кровь, не содержащую HbCO; * кровь пострадавшего при отравлении.

В образцы добавляют одинаковые объемы реактивов и наблюдают за изменением окраски. Это пробы Гоппе-Зейлера, Сальковского–Катаямы, Хорошкевича–Маркса, Бюркера, Сидорова и др. *Изменение окраски происходит только в образцах с нормальной кровью*. Окраска образцов крови пострадавшего при отравлении не изменяется или изменяется незначительно.

Экспресс-тесты, или пробы, проводят непосредственно *на месте происшествия* или *сразу после поступления* пострадавшего в клинику. Цель — быстро установить наличие HbCO. Тесты непригодны для определения малых количеств HbCO.

ГХ. Газохроматографический анализ является достаточно простым и *прямым* методом определения общего количества CO в крови. Высвобождение CO из HbCO крови достигается обычно добавлением растворов натрия карбоната или некоторых других веществ. Газовая фаза вводится в хроматограф, снабженный детектором по теплопроводности. Концентрация CO определяется по калибровочному графику после расчета площади пика. Результаты метода достоверны при концентрации HbCO 30–100%. Ошибка при использовании метода составляет 10%.

Другой вариант газохроматографического определения CO в крови основан на переведении его в метан или CO~2~ за счет каталитического восстановления водородом или окисления на силикагеле с пятиокисью иода. *В первом*

случае после высвобождения CO из крови в реакторе-дозаторе газовую смесь гелием мгновенно выталкивают из реактора в хроматографическую колонку, где CO каталитически восстанавливается водородом до метана и регистрируется ПИД. *Во втором случае* CO~2~ и CO разделяются на одной колонке с силикагелем, а затем в ячейке с пятиокисью иода CO окисляется до CO~2,~ и последний регистрируется детектором. Разница величин интенсивности пиков до и после окисления позволяет установить концентрацию CO.

Спектрофотометрический метод. Спектрофотометрический метод определения CO наиболее распространен, потому что все гемоглобиновые структуры имеют абсорбцию в определенной части спектра.

Объектами исследования на CO являются главным образом кровь пострадавшего (*диагностическое значение* имеет определение HbCO в крови, взятой непосредственно на месте происшествия) и воздух производственных или жилых помещений, содержащий CO. Существует большое число вариантов спектрофотометрического определения CO: метод Роке, микроспектральный анализ, модифицированный метод Вольфа, метод Фревурста–Майнеке и др.

Клинические химические лаборатории обычно оснащены *автоматизированными дифференциальными спектрофотометрами* (CO-оксиметрами), которые одновременно измеряют оптическую плотность гемолизированной крови на четырех и более длинах волн для определения общего гемоглобина, процентного содержания HbO, HbCO, метгемоглобина и сульфагемоглобина. Когда CO-оксиметры недоступны, используются другие методики спектрофотометрического анализа.

Методика количественного определения в крови HbCO спектрофотометрическим методом. При добавлении к исследуемой крови восстановителя (натрия тиосульфата) окси- и метгемоглобин количественно образуют восстановленную форму гемоглобина, которая имеет спектр поглощения, представленный на рис. 7-1 (кривая Б).

CO имеет большее сродство к гемоглобину, чем кислород, поэтому комплекс HbCO не может быть разрушен тиосульфатом натрия. Таким образом, после обработки тиосульфатом натрия комплекс HbCO проявляется характерным спектром с двумя максимумами поглощения (рис. 7-1, кривая А).

Максимальная разница оптической плотности между *спектрами А и Б* отмечается при длине волны *540 нм*, тогда как при длине волны 579 нм оптическая плотность практически одинакова.

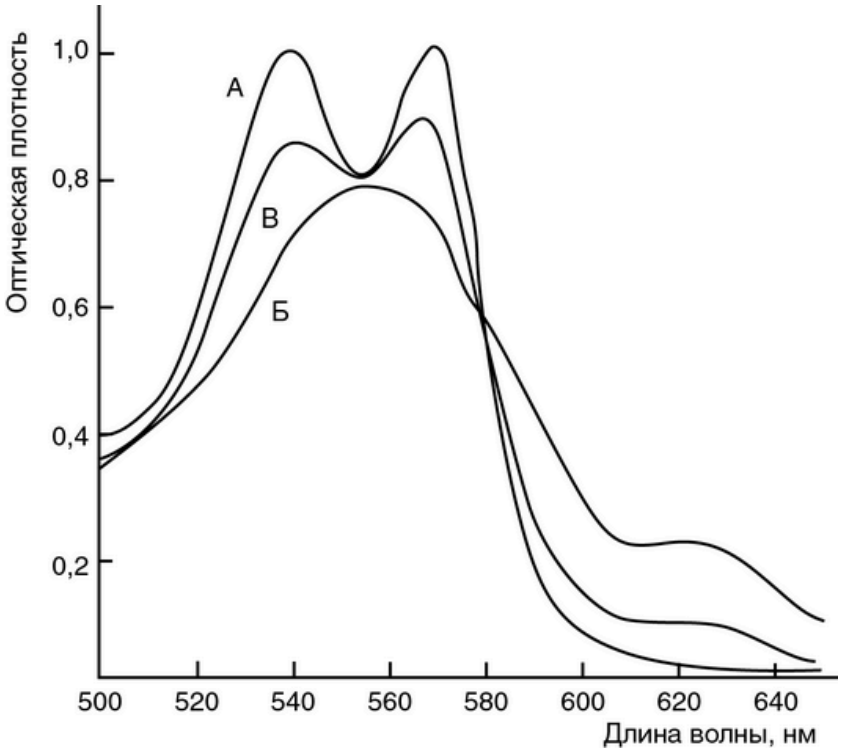


Рис. 7-1. Ультрафиолетовые спектры HbCO (А), восстановленного гемоглобина (Б) и крови пострадавшего при отравлении угарным газом (В)

Процентное содержание CO в крови пострадавшего может быть вычислено по формуле исходя из значения оптической плотности «здоровой», не содержащей HbCO крови (см. рис. 7-1, Б) и исследуемого образца (рис. 7-1, В) после добавления тиосульфата натрия:

$$\% = \frac{\chi(\text{B}) - \chi\,(<)}{\chi(\text{A}) - \chi\,(<)} \cdot 100\%,$$

где χ — оптическая плотность.

Интерпретация результатов (п. 1.4):

* содержание CO в крови <5%: норма; для курящих до 10%; * содержание CO в крови 10–20%: интоксикация легкой степени; * содержание CO в крови 20–30%: интоксикация средней степени; * содержание CO в крови 30–40%: интоксикация средней степени, но возможен коллапс; * содержание CO в крови 40–50%: интоксикация средней степени, выраженные расстройства дыхания и функций сердечно-сосудистой системы, часто коллапс, возможна смерть; * содержание CO в крови 50–60%: интоксикация сильной степени, кома, судороги, возможна смерть; * содержание CO в крови 60–90%: смерть.

Судебно-медицинская оценка **результатов количественного определения карбоксигемоглобина и карбоксимиоглобина.**

* Содержание HbCO в крови зависит прежде всего от концентрации CO во вдыхаемом воздухе и времени его воздействия. * Концентрация HbCO тем выше, чем выше парциальное давление CO в альвеолярном воздухе по сравнению с парциальным давлением O~2~. * За один и тот же промежуток времени при прочих равных условиях CO поступает в организм тем больше, чем больше минутный объем дыхания. * Соответствие между концентрацией HbCO и тяжестью отравления имеется не всегда. Это особенно отчетливо проявляется при групповых отравлениях. Необходимо учитывать очень разную чувствительность отдельных лиц к действию CO. При групповых отравлениях у некоторых лиц, находящихся в коматозном состоянии, содержание HbCO бывает гораздо ниже, чем у лиц, перенесших тяжелое отравление и при этом чувствующих себя удовлетворительно. * Смертельная концентрация HbCO в крови составляет в среднем около 60%, но может колебаться от 40 до 80% и более, что обусловлено влиянием внешних условий и особенностями организма. * Тяжесть острого отравления CO усиливается при низком барометрическом давлении, повышенной влажности, высокой или низкой температуре воздуха, усиленной мышечной работе. * При смертельном отравлении порог насыщения HbCO у пожилых людей ниже. У женщин отравление протекает легче, чем у мужчин. Беременные женщины более чувствительны, чем небеременные. Лица, подвергавшиеся хроническому воздействию CO, тяжелее переносят острое отравление. * Острое отравление проходит тяжелее у лиц, страдающих заболеваниями легких, сердца, нарушениями кровообращения, неврастенией, ожирением, анемией, перенесших черепно-мозговую травму, во время инфекционных заболеваний. * Данные о влиянии алкогольной интоксикации на тяжесть отравления CO противоречивы. * При сочетанном отравлении CO и оксидами азота, CO~2~, парами бензина, HCN (например, в результате пожара или технологического процесса) к смертельному исходу может привести относительно невысокая концентрация HbCO. * Встречаются атипичные формы отравления, протекающие с быстрой потерей сознания или тяжелыми расстройствами дыхания и сердечной деятельности. * Количественное содержание HbCO в крови, по-видимому, может зависеть от того, из какого участка кровеносной системы взята кровь для исследования. При вскрытии трупа кровь для исследования надлежит брать из правого предсердия (при наличии в нем крови) или бедренной вены либо из другого магистрального сосуда, а также из грудной или брюшной полости (при наличии излившейся в нее крови). * В некоторых случаях целесообразно измерять содержание HbCO в гематомах и кровоподтеках, так как оно может служить одним из признаков определения времени их возникновения. Считают, что гематомы, в которых содержание HbCO менее 10%, возникли до воздействия CO. Если содержание HbCO в них превышает 20%, то образование гематом связано с отравлением CO. * В воздухе промышленных городов постоянно содержится CO, вследствие чего в крови жителей обычно находится некоторое количество HbCO. Между концентрацией HbCO и степенью

загрязнения воздушной среды CO отмечена прямая зависимость. Например, в крови регулировщиков уличного движения содержание HbCO может достигать 22%. * При освидетельствовании лиц, перенесших отравление CO, нужно иметь в виду, что при интоксикации средней степени в течение 1-го часа выделяется около половины поступившего в организм CO. Полное освобождение организма от CO наступает спустя 10–12 ч, но может затягиваться и до 24 ч. * При обнаружении в крови трупа менее 60% HbCO необходимо проанализировать патологоанатомические данные и обстоятельства отравления, чтобы обосновать заключение о причине смерти. * При повышении поступления CO в организм соответственно увеличивается содержание CO в тканях. * Необходимость в исследовании скелетных мышц трупа или его частей возникает в очень редких случаях (например, при гнилостных изменениях резко обескровленных частей трупа), потому что для определения HbCO спектрофотометрическим методом необходим всего 1 мл крови из свежего или хранившегося до 10 дней биологического материала.

7.3.2. Цианистый водород

«Молекулы жизни из молекул смерти» —
этот афоризм выражает суть одной из гипотез,
подтвержденной многочисленными опытами:
постоянным субстратом самопроизвольного
синтеза аминокислот, белков и нуклеотидов
в добиологический (бескислородный) период развития
планеты Земля был цианистый водород HCN.

Из курса органической химии

Синильная кислота (HCN, цианистый водород, цианистоводородная кислота) — бесцветная прозрачная жидкость со своеобразным запахом, напоминающим запах горького миндаля, однако приблизительно 50% населения не способны распознать этот запах.

Температура плавления HCN 13,3 °C, кипения 25,7 °C, *очень летуча при обычной температуре*. Так, при 20 °C максимальная концентрация HCN достигает 837–1100 г / м^3^. Синильная кислота на воздухе быстро испаряется, в газообразном состоянии обычно бесцветна. С водой HCN смешивается во всех отношениях, легко растворяется в спиртах, бензине и других органических растворителях. *Пары хорошо адсорбируются текстильными волокнами и пористыми материалами, пищевыми продуктами, кирпичом, бетоном, древесиной.* HCN диффундирует даже через яичную скорлупу. Пары HCN выделяются, когда ее соли смешиваются с кислотами или попадают в *кислое содержимое желудка*.

Синильную кислоту *используют* для получения хлорциана, акрилонитрила, метилметакрилата, адипонитрила и других веществ, необходимых при производстве пластмасс, для синтеза бутадиен-нитрильных каучуков, для выработки волокна орлон или нитрон, а также в качестве фумиганта для окуривания цитрусовых и оливковых деревьев, для уничтожения насекомых и грызунов в зернохранилищах, закрытых помещениях и транспортных средствах. Большое количество синильной кислоты перерабатывается в аминокислоты, детергенты, комплексообразователи для металлургической промышленности. Соли синильной кислоты (цианиды) попадают в воздух рабочих помещений при получении бензола, толуола, ксилола, извлечении золота и серебра из руд, горении целлулоида, производстве «гремучей» ртути, гальванопластике, металлургии и др. Растворимые цианиды калия и натрия используют в промышленности (гальванические покрытия, обработка металла) и как лабораторные реактивы. Менее растворимые цианиды золота, серебра и ртути, так же как и растворимые соли, выделяют HCN при контакте с сильными кислотами.

HCN часто образуется при пожарах как продукт сгорания азотсодержащих материалов: шерсти, шелка, синтетических полимеров, полиуретанов, полиамидов и др.

Источниками цианид-ионов являются циансодержащие растения или их семена, которые могут быть случайно или преднамеренно включены в состав пищи.

HCN и ее соединения относятся к *чрезвычайно ядовитым веществам нейротоксического действия.*

Отравление HCN *в условиях производства* возможно главным образом в результате вдыхания газообразного цианистого водорода или при проникновении его через кожу. *Среднесуточная ПДК* синильной кислоты в воздухе населенных мест равна 0,01 мг / м^3^; в рабочих помещениях промышленного предприятия — 0,3 мг / м^3^.

Концентрация кислоты до 50 мг / м^3^ *при многочасовом вдыхании* опасна и приводит к отравлению. При 80 мг / м^3^ отравление возникает *независимо от экспозиции*.

Если 15 мин находиться в атмосфере, содержащей 100 мг / м^3 ^HCN, то это приведет к тяжелым поражениям, а свыше 15 мин — к *летальному исходу.* Воздействие концентрации 200 мг / м^3^ в течение 10 мин и 300 мг / м^3^ в течение 5 мин *смертельно.*

Дегазацию синильной кислоты на местности не проводят, так как она высоколетучая. Закрытое же помещение для этого достаточно хорошо проветрить или опрыскать формалином.

Отравление в быту может наступить при вдыхании паров HCN, попадании на кожу или в желудок. Всасывается очень быстро. *Смертельная доза* синильной кислоты 50–100 мг, цианидов натрия и калия 100 и 120 мг соответственно.

При вдыхании небольших концентраций синильной кислоты наблюдаются царапанье в горле, горький вкус во рту, головная боль, тошнота, рвота, боли за грудиной. При нарастании интоксикации урежается пульс, усиливается одышка, развиваются судороги, наступает потеря сознания. Кожа при этом ярко-розовая, слизистые оболочки синюшны.

При вдыхании высоких концентраций синильной кислоты или *попадании ее внутрь* появляются клонико-тонические судороги, резкий цианоз и почти мгновенная потеря сознания вследствие паралича дыхательного центра. Смерть может наступить в течение нескольких минут (молниеносная или апоплексическая форма отравления).

Механизм токсического действия цианид-ионов, попавших в кровь и ткани, реализуется путем *взаимодействия с железом(III) цитохромоксидазы*, которая утрачивает при этом свою физиологическую активность. Блокада транспорта цитохромов, резкое замедление окислительно-восстановительных процессов вызывают клеточную гипоксию, которая непосредственно затрагивает ткани мозга и сердца. *С железом(II) гемоглобина цианид-ионы не реагируют.*

Если пострадавшему *быстро ввести* необходимое количество *метгемоглобинообразователя*, то образующийся метгемоглобин, в котором железо трехвалентно, вступит в химическое взаимодействие с токсикантом, связывая его и препятствуя поступлению в ткани. Более того, концентрация токсиканта в плазме крови понизится и возникнут условия для разрушения обратимой связи цианид-иона с цитохромоксидазой (рис. 7-2).

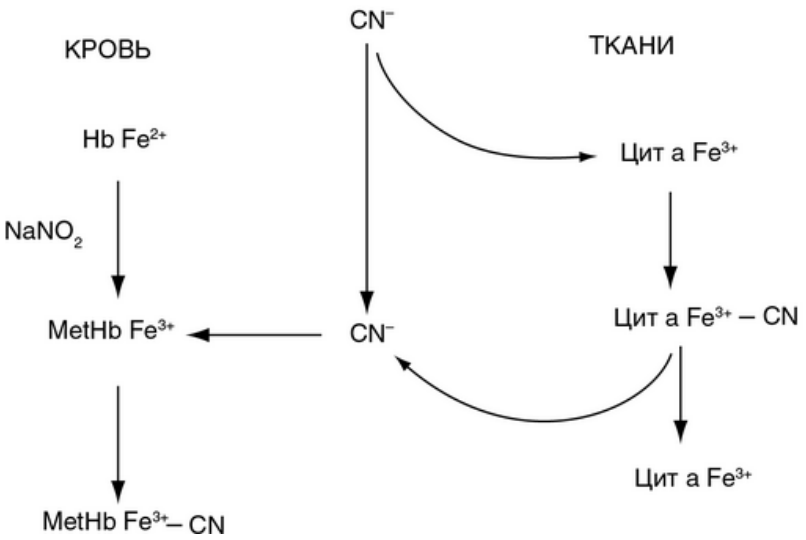


Рис. 7-2. Механизм антидотного действия метгемоглобинообразователей (например, NaNO~2~) при отравлении цианидами. MetHb — метгемоглобин

Токсикокинетика и биотрансформация

Цианистый водород и его соли всасываются через ЖКТ и легкие в течение нескольких секунд, проникновение через кожу происходит несколько медленнее. В печени цианид-ион биотрансформируется в тиоцианат-ион (SCN^–^), который значительно менее токсичен. Концентрация цианид-иона в крови быстро снижается (*T*~½~ от 1 до 2 ч). HCN выделяется из организма частично в неизмененном виде через легкие, с мочой и калом, частично в виде роданистых соединений через почки и ЖКТ.

Методы определения

В качестве объектов исследования используются:

* кровь (10 мл), отобранная в пробирку с ЭДТА (цианид в крови устойчив при хранении в течение 1 нед при 3 °C, но неустойчив при замораживании или комнатной температуре); * желудок с содержимым (важно в посмертной экспертизе); * другие органы; * вещественные доказательства.

Пробы крови берут *из периферийных участков*, например из бедренной вены. При приеме цианидов с пищей концентрации цианид-иона в крови, взятой из сердца, могут достигать 50 мг / л.

На *количественное содержание* цианидов оказывают влияние процессы гниения из-за бактериальной или грибковой контаминации, в результате которого происходит разложение цианидсодержащих веществ, находящихся в организме. Поэтому необходимо собирать кровь в пробирки, содержащие *не только антикоагулянты, но и фторид натрия* (см. гл. 4).

Определение цианидов осуществляют после *пробоподготовки*, проведенной с помощью дистилляции (*сбор пробы только в 10% водный раствор гидрокисида натрия*) или микродиффузии (см. п. 7.2).

Современная техника пробоотбора — ТФМЭ хорошо сочетается с автоматическим устройством для ввода проб в хроматограф при хроматографическом анализе (см. гл. 4 и п. 5.3).

В настоящее время для определения цианидов применяют:

* УФ-спектроскопию; * ГЖХ (ПИД, термоионный детектор — ТИД или ЭЗД); * ВЭЖХ-МС.

Сравнение двух методов определения HCN в крови — хроматографического и спектрофотометрического — показало, что между полученными результатами нет видимых статистических различий. Однако *меньшее время* анализа и *лучшие метрологические* характеристики отмечены при использовании ГЖХ. Предел обнаружения равен 1,5 пмоль и 1,1 нмоль при относительном стандартном отклонении 0,05 и 0,08 соответственно, а время анализа методом ГЖХ составляет 8 мин, в то время как спектрофотометрирование занимает более 2 ч.

При определении *методом ГХ* строят градуировочный график на основе анализа равновесного пара, образующегося при взаимодействии этилроданида с дитиотрентолом (в буферном растворе, содержащем ЭДТА) при 60 °C в течение 15 мин. Образующиеся летучие продукты анализируют на капиллярной колонке (25 м × 0,53 мм) при 100 °C и применении ТИД.

В образцах цельной крови HCN можно определять *в равновесной паровой фазе* методом ГХ с ТИД и с использованием *криогенной печи.* При низкой температуре печи без потерь вводят в капиллярную колонку 5 мл равновесного пара, что позволяет *в 10–100 раз повысить чувствительность по сравнению с традиционными методиками*. При применении в качестве внутреннего стандарта пропионитрила предел обнаружения равен 2 нг / мл (относительное стандартное отклонение 0,029–0,118). Методику используют *в СХА.*

Парофазное реакционно-хроматографическое разделение (см. п. 5.3) HCN в крови основано на ее превращении в хлорциан (CNCl) в колонке-реакторе с хлорамином и детектированием с помощью ЭЗД, предел обнаружения равен 005 мкг / мл.

Спектрофотометрическая методика основана на взаимодействии HCN с хлорамином Т, введении окрашенного реагента (барбитуровая кислота в растворе пиридин — 12 М HC1) и измерении оптической плотности продукта

реакции при 580 нм.

При *судебно-химическом исследовании* биологических объектов необходимо учитывать перечисленные ниже обстоятельства.

* Содержание цианидов в биожидкостях и тканях погибших при отравлении HCN снижается в последовательности: желудок с содержимым > кровь > печень > почки > кишечник с содержимым > головной мозг > моча. * Естественные количества цианидов, содержащиеся в органах и биологических жидкостях человека, можно обнаружить современными физико-химическими методами (например, в равновесной паровой фазе методом ГХ с ТИД и с использованием криогенной печи), чувствительность химических реакций недостаточна. * Количественное определение цианидов в содержимом желудка следует проводить обязательно, если путь приема токсиканта является сомнительным или неизвестным.

Интерпретация результатов:

* концентрация цианид-иона в крови менее 0,05 мг / л — результат метаболических процессов; * концентрация цианид-иона до 1 мг / л в крови (как в предсмертных, так и посмертных образцах) наблюдается при ингаляционном пути введения токсиканта (например, при пожарах); * концентрация цианид-иона в крови до 1 мг / л вызывает незначительное токсическое действие; * концентрация цианид-иона в крови 17–20 мг / л вызывает значительные повреждения и смерть. * при летальных исходах после перорального приема цианидов с пищей концентрация цианид-иона в крови редко составляет более l0 мг / л.

Неотложная помощь при отравлении цианидами:

* ингаляция амилнитрита (2–3 ампулы); * 50 мл 30% раствора тиосульфата натрия внутривенно; * 50 мл 1% раствора метиленового синего внутривенно; * 10 мл 1% раствора нитрита натрия внутривенно медленно через 10 мин 2–3 раза; * 20–40 мл 40% раствора глюкозы внутривенно; * кордиамин, эфедрин подкожно; * одновременно с антидотной терапией ингаляция кислорода.

При попадании токсиканта в ЖКТ необходимо промыть желудок 0,1% раствором перманганата калия или 5% раствором тиосульфата натрия.

При нарушении дыхания рекомендуется цититон, лобелин, при коме — искусственная аппаратная вентиляция легких.

Амигдалин

Амигдалин — β-D-O-глюкозид, содержащий цианогруппу. Он обнаружен в ядрах миндаля, абрикосов, вишен, персиков, корне маниоки и других растениях. В 100 г сырых ядер абрикоса содержится 217 мг цианидов.

Амигдалин может гидролизироваться ферментами или кислотой (щелочью) сначала до манделонитрил-β-D-O-глюкозида и D-глюкозы, затем до манделонитрила и D-глюкозы и, наконец, до бензальдегида и цианистого водорода. Эта реакция при попадании влаги катализируется группой ферментов (эмульсинов), присутствующих в ядрах плодов, которые содержат амигдалин. Если плоды попали внутрь, то реакция продолжается в кислой среде желудка или щелочной кишечника (из-за присутствия бактериальных гидролитических ферментов).

В плазме или моче амигдалин определяют после ферментативного гидролиза в присутствии бензальдегида методами УФ-спектрометрии, ГЖХ (ДИП или ЭЗД), ВЭЖХ-МС.

7.3.3. Сероводород, оксиды азота

Самые простые вещи,
встречающиеся на каждом шагу,
могут стать источником
научного открытия.

Александр Леонидович Чижевский (1897–1964),
выдающийся советский ученый, биофизик,
один из основоположников гелиобиологии,
космической биологии и космической экологии,
поэт, художник, «русский Леонардо да Винчи»,
действительный член 18 академий мира

Сероводород (H~2~S) — бесцветный газ с характерным резким неприятным запахом. Смеси сероводорода с воздухом, содержащие от 4 до 45 об.% этого газа, взрывоопасны. Сероводород может встречаться как в производственных, так и в природных условиях. В воздухе канализационных сетей концентрация сероводорода может достигать 2—16%. В ряде производств сероводород выделяется в воздух в качестве побочного продукта. Источником сульфид-иона при отравлении человека является газообразный сероводород как продукт разложения органических соединений. ПДК сероводорода в рабочем помещении промышленного предприятия 10 мг/м^3^ (0,01 мг/л).

Токсическое действие

Сероводород оказывает нейротоксическое действие, обусловленное развитием тканевой гипоксии, и местное раздражающее действие. Характерно поражение слизистой оболочки глаз — конъюнктивит, светобоязнь. Роговица покрывается точечными поверхностными эрозиями. Опасность отравления увеличивается в связи с потерей обоняния под действием H~2~S, что ограничивает возможность своевременного выхода из загрязненной атмосферы.

При концентрации H~2~S в воздухе 0,02—0,2 мг/л появляются симптомы интоксикации: насморк, кашель, резь в глазах, блефароспазм, бронхит, головная боль, тошнота, рвота, возбуждение, в тяжелых случаях кома, судороги, токсический отек легких.

Смертельная концентрация H~2~S в воздухе — 0,9—1,2 мг/л. Смерть наступает вследствие кислородного голодания, которое вызывается блокированием тканевого дыхания в связи с угнетением клеточных окислительно-восстановительных процессов.

Механизм токсического действия сульфидов, попавших в кровь и ткани, аналогичен механизму токсического действия цианидов.

Токсикокинетика и биотрансформация

Сероводород частично окисляется ферментами печени до тиосульфата, частично в неизмененном виде выводится через легкие. В определенных фракциях крови существует в виде сульфогемоглобина, образуемого в результате взаимодействия гемоглобина с продуктами метаболизма эндогенной серы.

У здоровых людей, не подверженных воздействию сероводорода, соотношение концентраций тиосульфата и креатинина в моче постоянно. При воздействии сероводорода соотношение концентраций линейно увеличивается в течение 15 ч, а затем в течение многих часов постепенно снижается до нормального значения.

Употребление пищи или воды с высоким содержанием серы может значительно увеличить концентрацию тиосульфата в моче, что усложняет интерпретацию данных при отравлении сероводородом.

Содержание сульфида в образцах тканей человека, взятых посмертно (кровь, мозг, легкие, бедренная мышца), зависит от температуры хранения биообъектов: увеличивается при температуре выше 20 °C.

Методы определения

В биологических объектах (после пробоподготовки способом микродиффузии) сульфиды могут определяться:

* колориметрически (по количеству сульфидов и тиосульфатов в крови или по количеству тиосульфатов в моче); * с помощью ион-селективного электрода; * методом ГХ-МС с квадрупольным анализатором ионная ловушка; * методом ВЭЖХ-МС.

Трудности при анализе сульфидов возникают в связи с быстрой потерей сульфидов из биологических материалов и образованием значительного количества сульфидов во время хранения *in vitro* тканей при температуре выше 20 °C.

Наиболее распространенным способом определения в биологических жидкостях *смеси ионов, включающей бромид-, иодид-, цианид-, роданид-, нитрит-* и *сульфид-ионы*, является перевод их в летучие пента-фторбензильные производные, которые можно детектировать с помощью ПИД и ЭЗД методом ГЖХ. В последнем случае концентрацию сульфидов в биологических объектах можно определить на уровне нескольких нанограммов на 1 мл.

Детоксикация — прекращение дальнейшего контакта с газом; ингаляция амилнитрита, длительная ингаляция кислорода, гипербарическая оксигенация, симптоматическая терапия.

Оксиды азота

Токсичными компонентами выхлопных газов бензиновых и дизельных двигателей (помимо CO) являются оксиды азота (NO, NO~2~), которые образуются в результате реакции окисления азота кислородом воздуха под воздействием высоких температур и давления в цилиндрах двигателя. NO является промежуточным продуктом при получении азотной кислоты окислением аммиака или азота воздуха, а также выделяется при сварочных работах. ПДК NO 5 мг/м^3^.

Диоксид азота (NO~2~) образуется при использовании концентрированной азотной кислоты (например, при нитровании целлюлозы, глицерина, травлении меди и медных сплавов), применяется как гомогенный катализатор при получении серной кислоты камерным (башенным) способом. ПДК NO~2~ 2 мг/м^3^.

Роль NO в организме многообразна, так как он способен реагировать с большинством биологически активных веществ *in vivo*. Взаимодействие NO со свободным кислородом приводит к образованию высокотоксичного диоксида азота NO~2~, однако эта реакция в физиологических условиях протекает медленно и при низких концентрациях NO *in vivo* не играет существенной роли в токсическом повреждении клеток, однако патогенные эффекты резко возрастают при его гиперпродукции.

NO~2~ оказывает выраженное раздражающее и прижигающее действие на дыхательные пути, особенно глубокие, что приводит к развитию токсического отека легких; угнетает аэробное и стимулирует анаэробное окисление в легочной ткани.

Оксид азота (N~2~O) — невоспламеняющийся газ почти без запаха, был открыт в 1776 г., а его свойства как анестетика были определены уже в 1799 г., но применять в лечебных целях N~2~O начали с 1860 г.

Вдыхание воздуха, содержащего N~2~O в концентрации 40%, сопровождается беспокойством, спутанностью сознания и седативным эффектом. Пороговое ограничение для профессионального использования 90 мг/м^3^. Воздух, содержащий 80% N~2~O, вызывает бессознательное состояние у большинства людей. Этот газ угнетающе воздействует на ЦНС и может вызвать асфиксию, предсказать его влияние на конкретного человека невоможно, поэтому забава с воздушными шариками, наполненными смесью N~2~O с кислородом, может закончится смертью. Использование чистого N~2~O **всегда** вызывает гипоксию мозга и летальный исход.

Возможен летальный исход при злоупотреблении N~2~O.

Методы определения

Оксиды азота (NO, NO~2~, N~2~O) определяют в биологических пробах методами:

* ИК-Фурье-спектрометрии (время измерения 3 мин); * методом ГХ; * методом ГХ-МС (N~2~O можно определять в моче).

7.4. Пестициды

Мы беспечно устремляемся к пропасти, заслонив глаза чем попало, чтобы не видеть, куда бежим.

Блез Паскаль (1623–1662), выдающийся
французский математик, механик, физик,
автор основного закона гидростатики, один из основателей
матанализа и теории вероятности,классик французской литературы, философ

7.4.1. Классификация пестицидов

Пестициды — химические средства, применяемые в сельском хозяйстве для защиты растений от различных видов вредных организмов и сорняков, а также в гигиене людей и животных. Термин «пестицид» охватывает множество разнообразных веществ, имеющих свойство уничтожать нежелательные формы жизни.

Потенциальная опасность для живой природы и людей, непредотвратимость циркуляции пестицидов в биосфере и в связи с этим контакт большого количества людей с ними отличают пестициды от прочих химических веществ, используемых человеком. Более тысячи пестицидов используется сегодня в мире. Большинство из них имеет общепринятые названия, согласованные с Международной организацией по стандартизации (International Standardisation Organisation — ISO). Существуют различные подходы к классификации пестицидов.
Их классифицируют по назначению, способности проникать в организм вредителя, характеру и механизму действия, токсичности и другим признакам (табл. 7-12).

Таблица 7-12. Классификация пестицидов по назначению, способу проникновения и характеру действия

Группа пестицидов	**Назначение, способ проникновения и характер действия**
Инсектициды	
Контактного действия	Вызывают гибель вредных насекомых при контакте
Кишечного действия	Вызывают гибель насекомых при попадании в кишечник
Системного действия	Способны продвигаться по сосудистой системе растения и отравлять поедающих его насекомых
Фумиганты	Действуют в газообразном состоянии через органы дыхания насекомых
Гербициды	
Контактного действия	Вызывают гибель сорных растений при контакте
Системного действия	Способны продвигаться по сосудистой системе растения и вызывать его гибель
Почвенного действия	Действуют на корневую систему растений или на прорастающие семена
Избирательного действия	Поражают только определенные виды растений
Сплошного действия	Уничтожают всю растительность
Фунгициды	
Контактного действия	Используют для борьбы с патогенными грибами
Системного действия	Способны продвигаться по сосудистой системе растений и убивать патогенные грибы
Защитного действия	Способны защитить от воздействия патогенных грибов
Лечебного действия	Способны давать лечебный эффект при действии патогенных грибов
Другие группы	
Ларвициды	Уничтожают личинок и гусениц насекомых
Акарициды (органотины)	Уничтожают растительноядных клещей
Овициды	Уничтожают яйца вредных насекомых и клещей
Нематоциды (фораты)	Уничтожают круглых червей
Зооциды, или родентициды	Уничтожают грызунов
Моллюстициды (никлозамиды)	Уничтожают моллюсков
Бактерициды	Уничтожают болезнетворные бактерии

К пестицидам также относят химические средства, стимулирующие и тормозящие рост растений (регуляторы роста растений), препараты для удаления листьев растений (дефолианты), препараты для подсушивания растений (десиканты), препараты для отпугивания (репелленты) и привлечения (аттрактанты) насекомых.

Классификация пестицидов по токсичности

Обладая выраженной биологической активностью, пестициды могут оказывать токсическое действие на организм животных и человека, что приводит к нарушению работоспособности человека, заболеванию и даже к смерти. Степень токсичности пестицидов зависит от пути их поступления в организм (ингаляционный, пероральный, трансдермальный и др.), от индивидуальных особенностей организма (возраст, пол, наследственность, заболевания и т.д.) и ряда других факторов.

Классификация по степени опасности отравления предложена специалистами ВОЗ и основана на величине *LD*~50 ~пестицидов для крыс в зависимости от пути введения токсикантов и их агрегатного состояния (табл. 7-13).

Таблица 7-13. Классификация пестицидов по степени опасности отравления

	***LD*~50~ для крыс, мг / кг массы тела**			
Класс опасности	**перорально**		**трансдермально**	
	твердые	**жидкие**	**твердые**	**жидкие**
IA — крайне опасные	5 и менее	20 и менее	10 и менее	40 или менее
IB — высокоопасные	5–50	20–200	10–100	40–400
II — умеренно опасные	50–500	200–2000	100–1000	400–4000
III— малоопасные	Около 500 более 2000*	Около 2000 более 3000*	Около 1000	Около 4000

* Допускается только для некоторых пестицидов.

Опасность отравления пестицидами зависит:

* от природы соединения; * агрегатного состояния (жидкая форма пестицида более опасна, чем твердая); * продолжительности контакта; * степени летучести токсиканта; * устойчивости в окружающей среде (персистентность); * способности к кумуляции (накопление в организме).

Персистентность очень важна для оценки токсичности пестицидов. По устойчивости в почве выделяют пестициды:

* очень стойкие (период разложения составляет более 1 года); * стойкие (период разложения составляет от 6 мес до 1 года); * умеренно стойкие (период разложения составляет 1–6 мес); * малостойкие (период разложения составляет до 1 мес).

Кумуляция пестицидов в организме человека и животных характеризуется *коэффициентом кумуляции,* который определяется отношением суммарной дозы препарата, вызывающей гибель 50% подопытных животных при многократном введении, к дозе, вызывающей гибель 50% животных при однократном введении.

* Коэффициент кумуляции менее 1: вещество обладает сверхкумуляцией. * Коэффициент кумуляции 1–3: вещество обладает выраженной кумуляцией. * Коэффициент кумуляции 3–5: вещество обладает умеренной кумуляцией. * Коэффициент кумуляции более 5: вещество обладает слабовыраженной кумуляцией.

Пестицидам различных классов присущи в большей или меньшей степени иммунотоксичность, эмбриотоксичность, гепатотоксичность и другие виды токсичности.

Для отнесения пестицида к тому или иному классу опасности в первую очередь учитывается *свойство, определяющее его опасность*. Это значит, что даже малотоксичное вещество, но обладающее канцерогенным или мутагенным свойством, может быть отнесено к I классу опасности. Если пестицид по одному из показателей

относится к первой группе гигиенической классификации (см. гл. 1), он очень опасен для людей и теплокровных животных.

Для выбора методов определения пестицидов важно знать их свойства. В этом случае более удобна классификация по химическому строению.

В зависимости *от химического строения* пестициды подразделяют на две группы:

* неорганической природы (соединения мышьяка, таллия, меди, серы и др.); * органической природы синтетического или биологического происхождения.

Отдельно можно выделить *металлоорганические соединения*, например алкилртутные фунгициды.

Большинство пестицидов — это органические соединения, среди которых выделяют хлорорганические соединения — ХОС, фосфорорганические соединения — ФОС, синтетические пиретроиды — СП, карбаматы и т.д. Представители одного и того же класса, имея сходное химическое строение, могут иметь разнонаправленное действие (входить в различные группы по назначению), обладать иными токсическими свойствами.

Инсектициды подразделяются на восемь химических групп, пять из которых имеют важное токсикологическое значение: ФОС, ХОС, карбаматные соединения (эфиры карбаминовой кислоты), естественные и синтетические пиретроиды, производные мочевины.

Гербициды по своей химической структуре подразделяют на 12 групп, но наиболее важны в токсикологическом отношении только 7: хлорированные феноксикислоты, производные мочевины, триазины, урацилы, соединения с четвертичным азотом, карбаматы и тиокарбаматы, карбоциклические кислоты и эфиры. Также гербициды по химической структуре представлены амидами, хлорацетанилидами, органическими соединениями мышьяка и др.

К фунгицидам принадлежат соединения многих химических групп: бензимидазолы, дитиокарбаматы, ацилаланины, ФОС и др. Наиболее важные из них комплексы дитиокарбаматов с марганцем, никелем и цинком, а также органические и неорганические соединения меди и ртути.

Родентициды представлены тремя группами соединений: фосфином, солями таллия (обычно сульфатами), кумариновыми антикоагулянтами.

Акарициды, моллюстициды и нематоциды. Некоторые из этих соединений имеют более одной области применения и могут входить в вышеупомянутые группы веществ.

Формы применения пестицидов

Эффективность применения пестицидов зависит не только от действующего вещества, но и от выпускаемой формы препарата, условий, при которых оно контактирует с вредными организмами. Формы выпуска пестицидов: смачивающиеся порошки, концентраты эмульсий, гранулированные препараты, микрокапсулированные препараты, растворы, аэрозоли и др.

Основные требования, предъявляемые к пестицидам

Пестициды должны обладать наряду с высокой биологической активностью по отношению к различным видам вредных организмов и сорных растений комплексом свойств, обеспечивающих безопасность их использования. Важнейшими требованиями, предъявляемыми к пестицидам, являются:

* низкая токсичность для теплокровных животных и человека; * обязательное отсутствие у них бластомогенного, тератогенного, мутагенного, эмбриотоксического действия и других возможных отдаленных нежелательных последствий; * отсутствие резко выраженных кумулятивных свойств; * способность разлагаться в природных условиях на нетоксичные компоненты в течение не более 2 лет.

Учитывая токсичность пестицидов, а иногда их малую эффективность (например, резистентность к пестицидам переносчиков инфекционных заболеваний), Комитет экспертов ВОЗ предлагает использовать чередование

пестицидов, смеси пестицидов, синергисты пестицидов, чередование малых и больших доз, биологические методы борьбы.

Альтернативой использования ядохимикатов являются биологические пестициды. При биологической борьбе используют агенты, являющиеся токсичными или инфекционными только для насекомых-переносчиков или вредителей. Например, в Индии и Сомали борьбу с малярией ведут с помощью рыб, поедающих личинок комаров — переносчиков заболевания, а также с помощью клопов-гладышей, выпущенных на рисовые чеки. В Иране с этой целью используют грибы *Lugenidium gigantum*. Бактерия *Bacillus thuringiensis* продуцирует обширное и неоднородное семейство пестицидных белков. Многие из них токсичны для сельскохозяйственных вредителей, особенно бабочек, а два типа этих бактерий (серотип H-14J3 *B. thuringiensis* и *B. sphaericus*) продуцируют протеины, токсичные для личинок комаров и мошки. Активность H-14J3 *B. thuringiensis* и *B. sphaericus* обусловлена четырьмя различными белками с относительной молекулярной массой 27 300, 65 000, 128 000 и 135 000 Д**.** Вполне вероятно, что периодическое применение H-14J3 *B. thuringiensis* и *B. sphaericus* в качестве ларвицидов при чередовании с традиционными инсектицидами позволит предотвратить или отсрочить выработку резистентности к последним. Полезной тактикой предупреждения резистентности к бактериальным пестицидам может стать дальнейшее совершенствование их применения путем переноса генов *B. thuringiensis* трансгенным организмам (например, цианобактерий) при сохранении максимального разнообразия пестицидных белков.

7.4.2. Физико-химические свойства, метаболизм и токсичность

Лучше тигр на равнине,
чем змея в высокой траве.

Жюль Верн (1828–1905), выдающийся
французский писатель-фантаст,
географ, один из основоположников
научной фантастики, классик
приключенческой литературы

Тот, кто спасет хотя бы одну жизнь,
спасает весь мир.

Талмуд

Строение и физико-химические свойства пестицидов (изомерия, устойчивость при нагревании, действии света, влаги и кислорода воздуха, растворимость в воде и органических растворителях, кислотно-основные свойства, летучесть) должны учитываться при проведении ХТА (выбор способов пробоподготовки и методов определения, приготовление и хранение рабочих растворов, растворов сравнения и т. п.).

Диапазон токсичности пестицидов для людей довольно большой. Известно, что всего 100 мг тербуфоса, принятых внутрь, смертельны для большинства взрослых людей, в то время как другой пестицид — амитрол не ядовит в дозе нескольких сотен граммов. Даже в пределах одного класса пестицидов токсичность может значительно различаться. *Метаболиты многих пестицидов являются более токсичными веществами, чем исходные соединения.* Некоторые пестициды не проявляют высокой токсичности, но входящие в состав выпускаемых препаратов различные *наполнители* и *растворители* могут быть ядовитыми и служить главной причиной симптомов отравлений.

Источником отравлений людей и животных могут быть как сами пестициды, так и различные *объекты внешней среды*, содержащие их, например вода, растения, пищевые продукты, что связано с накоплением пестицидов в окружающей среде и перемещением их по пищевым цепям. Частая причина отравлений — несоблюдение правил безопасности при работе с пестицидами в быту и на производстве (*случайные, профессиональные, бытовые отравления*). Встречаются суицидальные отравления пестицидами.

При остром отравлении в первую очередь проявляются специфические симптомы отравления, зависящие от вида и функциональной роли определенных рецепторов токсичности, с которыми взаимодействует пестицид или его

метаболит. Постепенно появляются признаки поражения отдельных органов или систем.

При хронической интоксикации, в отличие от острой, проявлению специфических симптомов токсического поражения предшествует длительный период общесоматических расстройств (головная боль, головокружение, ломота в суставах, тошнота, рвота). У лиц, занятых в производстве пестицидов или постоянно использующих их, возможно хроническое отравление, прежде всего из-за способности пестицидов к кумуляции.

Представители одного и того же класса пестицидов имеют сходные свойства и часто один и тот же механизм действия.

Антихолинэстеразные препараты

Известно большое количество химических соединений, способных подавлять активность *холинэстэстеразы* (ХЭ). К соединениям, обладающим таким свойством, относятся *пестициды из группы ФОС и производных карбаминовой кислоты*, составляющие значительную часть ассортимента препаратов, широко используемых в сельском хозяйстве, среди которых инсектициды, акарициды, гербициды, нематоциды, дефолианты и другие ядохимикаты. Ведущим звеном в механизме действия этих веществ на организм человека и животных является нарушение каталитической функции фермента ХЭ во всех органах и структурах, имеющих холинергическую иннервацию, прежде всего в ЦНС. Поэтому ФОП и карбаматы относят к нервным или синаптическим ядам.

Фосфорорганические пестициды

Биологическое действие сложных эфиров фосфорной кислоты было обнаружено в 1932 г.: у людей, вдыхавших пары фтороангидрида диэтилфосфата, наблюдались сильные холинергические эффекты. В 1934 г. Шредер предложил использовать вместо никотина в качестве инсектицида тетраэтилпирофосфат. Он же положил начало разработкам, приведшим к получению нервнопаралитических газов табуна и зарина. После Второй мировой войны были синтезированы и апробированы в качестве инсектицидов более 10 000 веществ класса ФОС. Потенциальное количество соединений, которые можно создать на основе структуры, предложенной Г. Шредером (рис. 7-3), оценивается в 250 000 наименований.

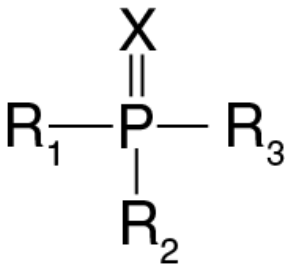


Рис. 7-3. Общая структурная фор мула ФОС

К настоящему времени известно более 100 коммерчески доступных ФОП, которые ежегодно производятся в количестве 1,5–2,5 · 10^5 ^т (табл. 7-14). К ним относятся эфирные, амидные или тиоловые производные фосфорной (дихлофос), тиофосфорной (метафос, трихлорметафос, меркаптофос и др.), дитиофосфорной (карбофос, фосфамид и др.), пирофосфорной, фосфоновой (хлорофос) кислот.

Таблица 7-14. Классификация фосфорорганических пестицидов

Подкласс	**R**~1~	**R**~2~	**R**~3~	**X**
Фосфородитионаты	О-алкил	О-алкил	S-алкил, S-арил	S
Фосфоротионаты	О-алкил	О-алкил	О-алкил, О-арил	S
Фосфоротиоаты	О-алкил	О-алкил	S-алкил, S-арил	О
Фосфаты	О-алкил	О-алкил	О-алкил, О-арил	О
Фосфонаты	О-метил	О-метил	Аллил, арил	О
Фосфонодитиоаты	алкил	О-алкил	S-арил	S
Фосфороамидотиоаты	О- или S-алкил	О-алкил	NH~2-~группа	О или S

ФОП представляют собой бесцветные или желтовато-коричневые твердые кристаллические вещества либо маслянистые жидкости. Многие из них имеют неприятный специфический запах, низкое давление пара, малорастворимы в воде, хорошо — в липидах. Большинство ФОП, за исключением дихлофоса, имеет сравнительно низкую летучесть, в воде подвергается гидролизу, образуя неядовитые соединения, опасность отравления которыми значительно меньше по сравнению с хлорорганическими пестицидами, которые более продолжительно воздействуют на организм.

В сельском хозяйстве используют главным образом *эмульсионные концентраты* или *влагопоглощающие порошки* для получения жидких аэрозолей и гранул. Летучие соединения используют ограниченно.

ФОП легко всасываются через кожу, попадают в организм через дыхательную систему и ЖКТ. Независимо от способа введения концентрация многих ФОП в мозге значительно меньше, чем в других тканях, что связано с их плохой проницаемостью через гематоэнцефалический барьер.

Биотрансформация ФОП происходит путем *окисления* и *гидролиза* при действии эстераз, что приводит к образованию продуктов различной токсичности. ФОП и их метаболиты *выводятся* в виде глюкуронидов с мочой и калом. Степень и время эффекта зависят от природы ФОП.

В результате биотрансформации нейротоксическая активность ряда ФОП может изменяться. Так, метаболизм триортокрезилфосфата (ТОКФ) в организме животных протекает с образованием циклического соединения *о*-полициклосалегининфосфата, нейротоксические свойства которого выражены *в 5 раз сильнее*, чем у ТОКФ. В процессе превращения лептофоса образуются такие метаболиты, как лептофосоксон и десбромлептофос, которые в *2–3 раза активнее*, чем лептофос. Метаболитом афоса является оксиосфонат, обладающий более сильным нейропаралитическим действием. При окислении паратиона образуется высокотоксичное соединение параоксон.

Некоторые *фосфоротиоаты* вследствие большей липофильности могут находиться в организме в неизмененном виде в течение многих дней или недель, что провоцирует *рецидив клинических проявлений* после улучшения. Другие, например дихлофос (О, О-диметил-О-2–2-дихлорвинил фосфат) и ометоат (диметилфосфоротиоат), быстро гидролизуются в неактивные соединения и не оказывают пролонгированного токсического действия.

Как правило, *ФОП не накапливаются в организме человека*. Однако после острой интоксикации ФОП обнаруживают в жировой ткани в течение нескольких недель.

ФОП *нарушают каталитическую функцию ХЭ* — расщепление ацетилхолина. АХ является медиатором ЦНС, синтезируется в нервных клетках из холина и уксусной кислоты при участии холинацетилазы (холинацетилтрансферазы) и ацетилкоэнзима А и накапливается в окончаниях нервных волокон, которые отделены от синаптической щели пресинаптической мембраной. За синаптической щелью шириной 20–50 нм расположена постсинаптическая мембрана. ХЭ располагается как на пресинаптической, так и на постсинаптической мембране.

Нервный импульс, достигая синаптического окончания, деполяризует его, в синапсе происходит обратимое увеличение концентрации ионов кальция, что и приводит к выбросу АХ в синаптическую щель. АХ взаимодействует на постсинаптической мембране с холинорецептором — мембранным комплексом белковой природы, имеющим анионный центр, который реагирует с катионной головкой АХ. Другой участок рецептора взаимодействует со сложноэфирной группировкой молекулы АХ, что приводит к открытию или закрытию ионных каналов, возникает деполяризация мембраны.

Антихолинэстеразные вещества нарушают цепь синаптической передачи возбуждения. Быстрый гидролиз АХ обеспечивают ферменты ХЭ, среди которых известны:

* ацетилхолинэстераза (АХЭ); * бутирилхолинэстераза (БуХЭ), или псевдохолинэстераза; * бензоилхолинэстераза (БеХЭ), или псевдохолинэстераза.

АХЭ, известная как истинная холинэстераза, содержится в эритроцитах, нервных окончаниях, легких и тканях мозга. Ее главная функция — гидролиз АХ в холинергических нервных окончаниях. Холинэстеразы БуХЭ и БеХЭ, известные как псевдохолинэстеразы (ПХЭ), содержатся в плазме и различных тканях организма. Точная

физиологическая функция ПХЭ неизвестна, но они обладают способностью *к гидролизу различных сложных эфиров* в отличие от АХЭ. Понижение активности ПХЭ может быть вызвано химическими соединениями, не являющимися пестицидами, патологией печени и другими факторами (физиологическими, фармакологическими или генетическими). Поэтому определение *активности АХЭ в эритроцитах* является более специфичным показателем ингибирования холинэстеразы, вызванного пестицидами из групп ФОП или карбаматов (см. ниже). Кроме того, снижение активности АХЭ в эритроцитах может обнаруживаться спустя 2–6 нед после воздействия токсиканта, активность *ПХЭ плазмы* возвращается к норме гораздо быстрее. Однако на практике активность ПХЭ плазмы — также важный показатель воздействия на организм пестицидов вышеупомянутых групп: *нормальная активность ПХЭ исключает острое отравление* этими веществами.

Гидроксигруппа серина и пиридиновый атом азота имидазола в гистидине — аминокислот, входящих в АХЭ, ответственны за ее реакционную способность по отношению к АХ. Конформационные изменения молекул субстрата и фермента обеспечивают высокую каталитическую эффективность и специфичность реакции АХЭ и АХ, которая протекает за несколько миллисекунд. АХЭ играет главную роль в гидролизе АХ.

ФОП вызывают *необратимое ингибирование АХЭ*, фосфорилируя фермент и накапливая АХ на чувствительных к нему рецепторах.

* Ацетилированный фермент — непрочное соединение, легко подвергающееся гидролизу, что освобождает активные центры ХЭ для новых реакций с АХ. * При фосфорилировании образуется чрезвычайно устойчивое к гидролизу соединение, утратившее свою каталитическую функцию и не способное реагировать с АХ. Устойчивость к гидролизу фосфорилированной ХЭ зависит от характера алкоксигрупп, связанных с фосфором, и увеличивается в последовательности: диметиловые, диэтиловые, диизопропиловые эфиры фосфорных кислот, последние практически необратимо угнетают ХЭ.

Строение ХЭ и холинорецепторов имеет много общего, поэтому ФОП могут взаимодействовать *не только с ферментом, но и с холинорецептором* (например, паратион).

Оптические и геометрические изомеры ФОП проявляют разную антихолинэстеразную активность.

Большей токсичностью и антихолинэстеразной активностью характеризуются соединения, в которых атом фосфора связан с кислородом, а не с атомом серы.

Клиника острой интоксикации ФОП включает *мускарино-* и *никотиноподобные* нарушения, изменения со стороны центральной нервной и дыхательной систем.

По требованиям ВОЗ препараты, оказывающие отдаленное нейротоксическое действие (через 14–21 день, а иногда через 1–5 лет после перенесенного острого отравления), приводящее к стойкой потере трудоспособности, не допускаются к внедрению в практику. К настоящему времени механизм отдаленного нейротоксического действия ФОП окончательно не выяснен, не установлена прямая связь между их антихолинэстеразным и нейропаралитическим действием. *Мишенью отдаленного нейротоксического действия* ФОП является специфический белок нервной ткани, так называемая *нейротоксическая (нейропатическая) эстераза* (НТЭ). Фосфорилирование эстеразы сопровождается гидролизом эфирной (P–O–C) или амидной (P–N–P) связи ФОП, приводящим к появлению ионизированной группы кислого характера. Снижение активности НТЭ регистрируют задолго до появления клинических признаков нейропатии. Развитие отдаленного нейротоксического действия связано не только с угнетением НТЭ, но и с последующим ее старением. *Под старением* понимают такое изменение структуры фосфорилированной НТЭ, в результате которого она *теряет способность к реактивации*. Ингибирование активности фермента менее чем на 70–80% не обеспечивает старение, и такие ФОП не вызывают отдаленного нейротоксического действия. У человека похожий на НТЭ фермент обнаружен в лейкоцитах и тромбоцитах периферической крови. В настоящее время определение в периферической крови этого фермента рассматривается как тест, предсказывающий у людей развитие поздних невропатий.

К ФОП, вызывающим невропатии, относятся:

* S, S, S-трибутил-фосфоротритиоат; * мерфос; * фентионы.

Достаточно сложно предоставить достоверные данные *о летальных дозах для человека*. Считается, что прием внутрь или ингаляционно 10–300 мг паратиона оказывает летальное воздействие на взрослого человека. Определена смертельная доза диазинона для человека, которая составляет 25 мг при приеме внутрь, средняя летальная доза малатиона равна примерно 60 г. Однако известны случаи, когда дети погибали от воздействия 0,1 мг / кг паратиона. При адекватном лечении можно пережить и воздействие намного более высоких доз на организм.

Лечение острых отравлений включает уход и специфическую терапию противоядиями для нейтрализации токсического действия ФОП. Как антидот используют атропин, который является блокатором М-холинорецепторов. Однако атропин не оказывает значительного влияния на скорость регенерации ингибированной АХЭ. Оксимы относятся к антагонистам ФОС, то есть это реактиваторы ХЭ. В результате деалкилирования некоторые ФОС вызывают настолько быстрое старение комплекса фермент–ФОС, что оксимы уже не могут оказать действия.

При использовании некоторых оксимов возможны тяжелые последствия, поэтому прежде чем назначать оксимы, необходимо идентифицировать ФОП.

Карбаматы (эфиры карбаминовой кислоты)

Термин «карбаматы» используют для обозначения класса органических соединений, являющихся *производными карбаминовой кислоты* и обладающих различной биологической активностью (инсектициды, гербициды, фунгициды, моллюскоциды). Карбаминовая кислота (амид угольной кислоты) в свободном состоянии неизвестна. Соли карбаминовой кислоты, напротив, устойчивы, и именно они носят название «карбаматы». В качестве пестицидов нашли применение не соли, а сложные эфиры карбаминовой кислоты — уретаны. В связи с этим использование термина «карбаматы» применительно к производным карбаминовой кислоты, являющимся пестицидами, *некорректно*. Тем не менее этот *термин принят в химии пестицидов* и будет нами использован при дальнейшем изложении материала.

Карбаматы представляют собой синтетические аналоги токсичного алкалоида физостигмина, выделенного из калабарских семян растения *Physostigma venenosum* в 1864 г. Химическая структура этого вещества была установлена Стедманом и Бейкером в 1925 г., а холинергические свойства описаны Леви в 1926 г.

Известно большое количество антихолинэстеразных карбаматов. Карбаматы, использующиеся в качестве пестицидов (КП), являются синтетическими производными сложных эфиров карбаминовой кислоты H~2~N–COOH (рис. 7-4). *Тиокарбаматы и дитиокарбаматы* рассматриваются ниже, они имеют иной механизм действия.

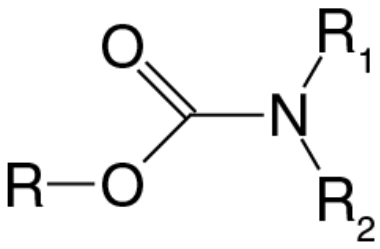


Рис. 7-4. Общая структурная формула карбаматов. R — в большинстве случаев радикалы бензола, нафталина или других соединений с ароматическим кольцом; R~1~ — обычно водород; R~2~ — обычно метильная группа

Среди КП выделяют: *карбоциклические, гетероциклические* и *оксипроизводные* карбаминовой кислоты. Большинство из них малорастворимо в воде и умеренно растворимо в бензоле, толуоле, ксилоле, хлороформе и 1,2-дихлорметане. Некоторые соединения плохо растворимы в неполярных органических растворителях, но хорошо растворимы в относительно полярных органических растворителях: метаноле, этаноле, ацетоне, диметилформамиде.

Как сложные эфиры они подвержены *гидролитическому разложению*, особенно в щелочной среде. При увеличении pH на каждую единицу выше 7,0 скорость гидролиза увеличивается приблизительно в 10 раз, при повышении температуры на 10 °C — почти в 4 раза. Неустойчивость этих соединений в щелочах используется *для очистки* и *обеззараживания* предметов от присутствующих на них карбаматов.

КП в основном применяют в сельском хозяйстве в качестве инсектицидов, фунгицидов, гербицидов, нематоцидов или для подавления роста сорняковых побегов. Кроме того, их используют в промышленности или других сферах деятельности, а также в домашнем хозяйстве как биоциды.

Соединения, применяемые в сельском хозяйстве, выпускают, как правило, в виде смачивающихся порошков, пылеобразных веществ, гранул и концентратов с эмульгирующей способностью.

Некоторые карбаматы выпускаются в комбинации с другими пестицидами. Это особенно важно для диагностики и выбора методов лечения при отравлениях.

КП *легко проникают* через неповрежденную кожу, слизистые оболочки, дыхательные пути и пищеварительный тракт. Опасность для здоровья представляет частое контактирование с КП, связанное с профессиональными обязанностями. Воздействие на организм происходит ингаляционным путем и через кожу, перорально — при суицидальных попытках и случайном приеме внутрь.

Производные метил- и диметилкарбаминовой кислоты подвергаются *окислению* (при участии различных оксидаз) либо *гидролизуются*. Реакции окисления включают N-деметилирование, гидроксилирование ароматического кольца, О-деалкилирование, алкильное гидроксилирование, сульфоокисление, превращение N-метильных групп в N-формамидные или N-гидроксиметильные группы, а также образование дигидроксипроизводных ароматического кольца. Как правило, метаболиты *менее токсичны, чем исходные карбаматы*.

КП быстро выводятся с мочой в свободном и конъюгированном (с серной или глюкуроновой кислотой) виде.

Например, пестицид карбарил биотрансформируется путем окисления, гидролиза и конъюгации (с глюкуроновой или серной кислотой). Образовавшийся при гидролизе β-нафтол составляет более 20% принятой внутрь дозы, выводится с мочой в свободном и конъюгированном виде вместе с небольшим количеством конъюгированного 4-гидроксикарбарила.

КП, подобно ФОП, снижают активность ХЭ, но ингибирование активного центра фермента обратимо.

Клинические проявления отравлений обоими типами веществ, т. е. карбаматами и ФОП, одинаковы, но у карбаматов они менее продолжительные. Опасность отравления при ежедневном воздействии токсикантов на организм не увеличивается, поскольку их количества недостаточно для немедленного проявления симптомов интоксикации. Обычно симптоматика отравления сохраняется не более 8 ч.

Метилкарбаматы угнетают активность ХЭ в *5–10 раз сильнее*, чем диметилкарбаматы.

АХЭ способна гидролизовать КП, хотя скорость гидролиза при этом будет ниже, чем при гидролизе естественного субстрата фермента — АХ.

Симптомы отравления проявляются, если количество пестицида в организме достигает того уровня, при котором скорость карбамилирования АХЭ превышает скорость гидролиза КП под действием фермента. При этом происходит накопление АХ в нейроэффекторном и синаптическом пространстве, что ведет к клиническим проявлениям, подобным отравлению ФОП. КП *не вызывают* длительных невропатий.

Токсичность КП колеблется в широких пределах. Большинство ароматических карбаматных сложных эфиров обладает низкой токсичностью при трансдермальном пути введения. Однако алдикарб проявляет сильное токсическое действие при попадании в организм как через кожу, так и перорально.

Доза большинства КП, при принятии внутрь которой возможна интоксикация с летальным исходом, составляет для человека 50–500 мг. Так, описан случай гибели в 2005 г. 27 филиппинских студентов после употребления в пищу корней маниоки, в которых содержались КП, часто используемые на фермах и в домашних хозяйствах на Бохоле.

Специфическое лечение заключается в применении атропина до тех пор, пока не появятся признаки атропинизации или обратная динамика симптоматики отравления. Очень важно поддерживать дыхательные пути свободными. При попадании токсиканта через рот можно провести промывание желудка. *Использование оксимов противопоказано*.

Наиболее широко применяемые КП: карбарил (севин), пиримор (пиримикарб, рапид), дравин 755 (алфилин, бутокарбоксим), пропоксур (байгон), алдикарб (симак, темик).

Дитиокарбаматы

Дитиокарбаматы (ДТК) — широко используемые фунгициды; их можно разделить на три группы: *тиурамы, диметилдитиокарбаматы и этилен-бис-дитиокарбаматы*.

Дисульфид углерода (CS~2~) и 2-тиотиазолидин-4-карбоновая кислота (ТТКК) являются *метаболитами*, общими практически для всех ДТК. Существенное повышение концентрации этих соединений в моче наблюдается при воздействии ДТК-пестицидов. *Этилентиомочевина* (ЭТМ) — основной метаболит этилен-бис-дитиокарбаматов. Она также присутствует в виде примеси при промышленном выпуске препаратов. ЭТМ считается тератогенной и канцерогенной для крыс и других видов животных, обладает тиреотоксичностью и широко используется для оценки воздействия этилен-бис-дитиокарбамата. ЭТМ — неспецифичное производное. Она может образовываться из манеба, манкоцеба или цинеба. В качестве альтернативного метода определения воздействия ДТК может использоваться определение металлов в моче пострадавших, так как ДТК легко образует комплексы с различными металлами *in vivo* (см. п. 7.5). Так, у рабочих, подвергшихся воздействию манкоцеба, повышается выведение марганца с мочой.

Хлорорганические пестициды

Хлорпроизводные алифатических, алициклических, ароматических углеводородов составляют большую группу пестицидов, применяемых в сельском хозяйстве. Представители этой группы обладают инсектицидной, акарицидной, фумигантной и другой активностью, но в основном это контактные инсектициды с длительным и широким спектром действия.

Хлорсодержащие пестициды (ХОП) условно принято делить на четыре группы:

* ДДТ и его аналоги; * гексахлорциклогексан (ГХЦГ); * циклодиены и их производные; * токсафен и его производные.

Вещества, входящие в эти группы, значительно различаются по способу применения, токсическому воздействию и соответственно способам лечения отравлений.

Для ХОП характерна *химическая стабильность*. Они плохо растворимы в воде, хорошо — в органических растворителях и жирах. Многие из них достаточно летучи, устойчивы к воздействию различных факторов внешней среды (температура, влажность и т.д.). Это обусловливает длительность защитного действия препаратов от вредителей, но создает *опасность загрязнения окружающей среды и сельскохозяйственной продукции*. Особенно большие количества ХОП поступают в атмосферу при использовании сельскохозяйственной авиации. ХОП переносятся с воздухом на большие расстояния. Фоновые концентрации гексахлорана и ДДТ в воздухе над океаном равны соответственно 0,4–0,6 и 0,03–1,0 нг / м^3^. Максимальные концентрации ХОП отмечаются в атмосфере в теплый период с пиковыми значениями весной и осенью. Концентрации ХОП в поверхностных водах составляют в среднем 1–50 нг / см^3^, что связано с их более высокой растворимостью в воде. ХОП хорошо адсорбируются органическим веществом почвы или донным илом и за счет этого способны перемещаться с поверхностными водами. Загрязнение водных объектов ХОП обусловлено поверхностным стоком с загрязненных полей, а также осаждением из атмосферы. Попадая в водоемы, ХОП сравнительно быстро перераспределяются между водой и донными отложениями. *Период полураспада в почве для большинства ХОП превышает 1,5 года,* а для некоторых (ДДТ, диэлдрин) составляет *15–20 лет и более*. Остаточные количества ХОП в сельхозпродукции *не удаляются* в процессе термической и кулинарной обработки.

Согласно данным ВОЗ, достоверно установлено *12 основных стойких органических загрязнителей — СОЗ* (см. гл. 9). К ним относятся диоксины, фураны, полихлорбифенилы (ПХБ), ДДТ, хлордан, гептахлор, гексахлорбензол, токсафен, алдрин, диэлдрин, эндрин, мирекс, бóльшая часть из которых являются ХОП.

Загрязненная ХОП рыба, а также растения, листья и побеги которых хорошо поглощают ХОП из воздуха, — основные источники поступления пестицидов в организм человека. Для человека и животных большинство соединений этой группы умеренно токсично и лишь некоторые высокотоксичны.

Отрицательным свойством ХОП является *резко выраженная способность к кумуляции*. При повторном попадании в организм даже малых количеств ХОП развивается хроническое отравление, что резко ограничивает возможность их широкого использования. Некоторые ХОП обладают мутагенным свойством, повышают риск развития рака, повреждают репродуктивную функцию. Их действие во многом аналогично действию диоксинов и дибензофуранов (см. ниже и гл. 9).

ХОП могут всасываться *через кожу* или поступать в организм *пероральным* и *респираторным* путем. Например, ДДТ в виде растворов плохо проникает через кожу. Диэлдрин, напротив, проникает через кожу настолько хорошо, что он в 2 раза токсичнее при трансдермальном, чем при пероральном пути введения.

При биотрансформации возможно образование *более токсичных метаболитов* (например, метаболит гептахлора — эпокись гептахлора).

Выводятся ХОП в основном с фекалиями и в меньшей степени с мочой.

ХОП обладают нейро-, гепато-, нефро-, гематотоксичностью, также вызывают нарушение функций эндокринной и сердечно-сосудистой систем.

Дихлордифенилтрихлорэтан и его аналоги

ДДТ был синтезирован в 1874 г. О. Цейдлером, но его инсектицидные свойства стали известны только в 1939 г. после опубликования работ П. Мюллера. Фактически с этого момента началась эра синтетических органических инсектицидов. Этому способствовала комбинация уникальных свойств ДДТ и его аналогов: широкий спектр инсектицидной активности; длительная сохраняемость в окружающей среде следов этих веществ; низкая острая токсичность для млекопитающих; низкая стоимость.

Термин ДДТ, или *п, п′*-ДДТ [1,1-ди (4-хлорфенил)-2,2,2-трихлорэтан] широко известен во всем мире. Структура ДДТ может иметь несколько изоформ. Структурная формула ДДТ и некоторых его аналогов приведена на рис. 7-5 и в табл. 7-15.

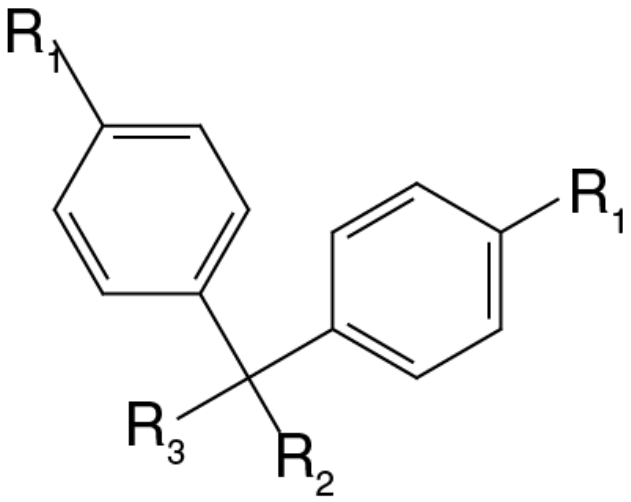


Рис. 7-5. Химическая структура производных *п, п′*-ДДТ

Структурные изомеры ДДТ — кристаллические соединения белого или слегка желтоватого цвета, не имеющие вкуса и почти не имеющие запаха, с эмпирической формулой C~14~H~9~Cl~5~ и относительной молекулярной массой 354,5 Д. Температура плавления *п, п′*-ДДТ 108,5–109 °С. ДДТ растворим в бензоле, циклогексане, хлороформе, практически нерастворим в воде.

Таблица 7-15. Структура *п, п′*-дихлордифенилтрихлорэтана и его аналогов

Название	**Химическое название**	**R**~1~	**R**~2~	**R**~3~
ДДТ	1,1-Ди (4-хлорфенил)-2,2,2-трихлорэтан	–Cl	–H	–CCl~3~
Дикофол (келтан)	1,1-Ди (4-хлорфенил)-2,2,2-трихлорэтанол	–Cl	–OH	–CCl~3~

Этилан (пертан)	1,1-Ди (4-этилфенил)-2,2-дихлорэтан	–C~2~H~5~	–H	–CHCl~2~
Метоксихлор	1,1-Ди (4-метоксифенил)-2,2,2-трихлорэтан	–OCH~3~	–H	–CCl~3~
Пролан	1,1-Ди (4-хлорфенил)-2-нитропропан	–Cl	–H	–NO~2~
ТДЭ*	1,1-Ди (4-хлорфенил)-2,2-дихлорэтан	–Cl	–H	–CHCl~2~

* В качестве инсектицида это соединение принято называть ТДЭ, как метаболит ДДТ — его называют ДДЕ.

ДДТ — сильнодействующий контактный инсектицид. Многочисленные исследования, проведенные по всему миру, показали, что следовые количества его могут оказывать серьезное воздействие на окружающую среду и человека (см. гл. 9).

Гексахлорциклогексан (ГХЦГ, линдан)

Линдан, 1α-,2α-,3β-,4α-,5α-,6β-гексахлорциклогексан (ГХЦГ), γ-ГХЦГ. Это вещество получило химически неправильное, но тем не менее широко используемое на практике другое название — «бензолгексахлорид» (БГХ).

БГХ, или ГХЦГ, впервые синтезирован Фарадеем в 1825 г. Его инсектицидные свойства независимо друг от друга открыты в 1941 г. в Великобритании Слайдом и во Франции Дюпере и Раукуртом. Соединение (рис. 7-6) имеет восемь стереоизомеров.

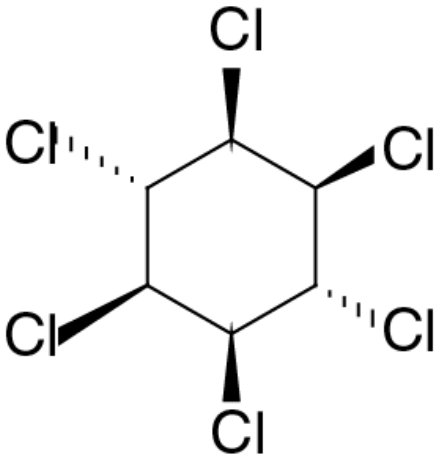


Рис. 7-6. Структурная формула γ -гексахлорциклогексана (ГХЦГ, БГХ, линдан)

Техническая смесь изомеров — беловато-коричневый порошок со стойким запахом плесени, умеренно растворимый в ацетоне, бензоле и хлорированных углеводородах, плохо растворим в керосине, жирах и маслах, а в воде практически нерастворим. При повышенной температуре возгоняется.

ГХЦГ применяется в сельском хозяйстве в виде дустов, смачивающихся порошков, концентратов эмульсий, дымовых шашек и др. Его используют в качестве инсектицида для борьбы с вредителями зерновых и садовых культур, паразитами животных и т.д.

Линдан — *СОЗ,* который накапливается в жировых тканях живых организмов.

В воде линдан стабилен: для биологического разрушения необходимо от 3 нед до 3 лет. Линдан очень токсичен для пчел и других полезных насекомых.

Применение препарата в РФ строго регламентировано. В настоящее время для защиты растений разрешается использовать линдан только в смесевых протравителях.

ПДК в воздухе 0,004 мг / дм^3^.

Линдан запрещен в большинстве стран. Индия и Румыния остаются единственными его производителями.
Во многих государствах, где линдан еще применяется, не ослабевает движение за прекращение его использования. Рабочая группа по пестицидам Всемирной сети по ликвидации СОЗ предлагает исключить линдан из обращения, несмотря на его высокую эффективность как инсектицида с широким спектром действия (см. гл. 9).

С 1998 по 2003 г. только в США было выявлено 870 случаев отравления линданом при его случайном проглатывании. Большинство случаев отравления (90%) были легкой или средней тяжести и проявлялись рвотой, тошнотой, раздражением слизистой оболочки полости рта и глотки, абдоминальными спазмами и судорогами.

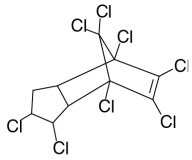
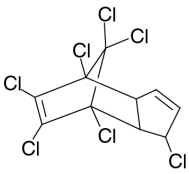
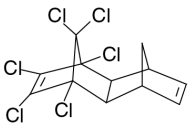
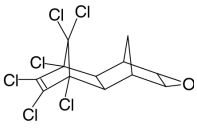
*При введении внутр*ь линдан из крови быстро перераспределяется в *жировую ткань*.

Биотрансформация линдана происходит в печени при участии ферментов цитохрома *P*450. Большое количество метаболитов, которые до сих пор полностью не изучены, образуется при реакциях *дегидрирования, дегидрохлорирования, дехлорирования, гидроксилирования.*

Циклодиены и их производные

Циклодиеновые производные (табл. 7-16) — алдрин, изодрин, дильдрин, эндрин и гептахлор — легко проникают *через кожу, легкие* и *ЖКТ*.

Таблица 7-16. Строение и свойства циклодиеновых производных

Пестицид	Структурная формула	Молекулярные формула и масса, Д	Температура плавления, °С	Растворимость	Примечание
Хлордан		C~10~H~6~Cl~8~, 410	*Цис*-изомер 106–107, *транс*-изомер 104–105	Растворим в большинстве органических растворителей, практически нерастворим в воде	Технический продукт — густая, вязкая жидкость янтарно-желтого цвета, содержащая около 45 компонентов
Гептахлор		C~10~H~5~Cl~7~, 373,5	Чистый продукт 95–96, технический продукт 46–74	Растворим в ацетоне, бензоле, четыреххлористом углероде, циклогексаноне, керосине и этаноле	Чистый продукт — белое кристаллическое вещество без запаха, технический продукт содержит около 72% гептахлора и 28% его производных
Алдрин		C~12~H~8~Cl~6~, 365	Чистый продукт 104, технический 49–60	Умеренно растворим в сложных эфирах и кетонах, ароматических соединениях, галогенозамещенных углеводородах, трудно — в спиртах	Чистый продукт — белое кристаллическое вещество без запаха, технический продукт содержит не менее 90% алдрина
Дильдрин		C~12~H~8~Cl~6~O 381	176–177	Малорастворим в алифатических углеводородах и спиртах, умеренно растворим в ацетоне, растворим в ароматических и галогенозамещенных углеводородах	Чистый продукт — белое кристаллическое вещество без запаха, технический продукт содержит не более 5% других веществ
Эндрин	Стереоизомер дильдрина	C~12~H~8~Cl~6~O, 381	235	Практически нерастворим в воде, растворим в органических расстройствах	Чистый продукт — белое кристаллическое вещество без запаха

Трансдермальная абсорбция циклодиеновых производных, определенная на добровольцах, составляла 7–8% дозы, нанесенной на кожу. До 50% вдыхаемого алдрина всасывается и аккумулируется в организме. Процентное соотношение введенного внутрь и непосредственно всосавшегося алдрина не установлено.

После всасывания алдрин быстро распределяется по органам и тканям, после чего устанавливается *подвижное равновесие* между его концентрацией в крови и других органах.

Алдрин легко превращается в *дильдрин*, главным образом в печени, где через 2 ч после введения алдрина можно обнаружить присутствие дильдрина. Алдрин и дильдрин при биотрансформации образуют одинаковые основные метаболиты — 9-гидроксипроизводное и транс-6,7-дигидроксипроизводное.

Дильдрин и другие циклодиены накапливаются преимущественно *в жировой ткани*.

Одни циклодиены *элиминируются в неизмененном виде, другие биотрансформируются в печени с образованием гидрофильных метаболитов, которые экскретируются с желчью и калом.* При анализе кала было обнаружено только 9-гидроксипроизводное.

Гептахлор при попадании в организм через ЖКТ окисляется до эпоксигептахлора — продукта более токсичного, чем гептахлор; оба *накапливаются* в тканях организма.

Дильдрин, так же как и ДДТ, является инсектицидом; он более эффективен и более стоек, чем ДДТ. В тех случаях когда у насекомых вырабатывалась устойчивость к ДДТ, часто использовали дильдрин. Концентрирование дильдрина при движении по пищевой цепи хорошо демонстрируют исследования, проведенные в Балтийском море: концентрация дильдрина в зоопланктоне составляла 21 нг / г жира, тогда как в конечном звене пищевой цепи — сельди — она была равна 121 нг / г жира. Обследуя население США и Канады, ученые показали, что дильдрин присутствует в тканях, крови и грудном молоке обследуемых.

Дильдрин является канцерогеном и запрещен к применению во всех странах (см. гл. 9), хотя за счет своей высокой устойчивости он еще долго будет оказывать влияние на различные экосистемы и здоровье населения.

Токсафен и его производные

Токсафен — сложная смесь *нескольких сотен соединений*, которые образуются при фотохлорировании бициклического терпена камфена. Теоретически в смеси может находиться 32 768 различных соединений. В техническом токсафене содержатся наиболее активные из них — 2,2,5-эндо-6-экзо-8,9,10-гептахлороборнан и 2,2,5-эндо-6-экзо-8,9,9,10-октахлороборнан (рис. 7-7), суммарное содержание которых составляет 2–6%. Количество изомеров только этих производных (Cl~7~ и Cl~8~) может составить 6840. В 1993 г. было сообщение, что из технического токсафена удалось выделить 670 индивидуальных соединений. В окружающей среде количество изомеров токсафена должно быть меньше из-за агрессивного влияния внешних условий и в результате биотрансформации.

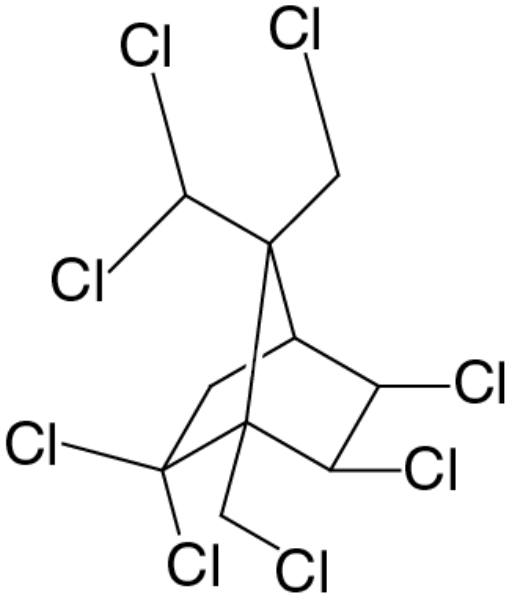


Рис. 7-7. Структурная формула одного из изомеров токсафена

Технический токсафен — воскоподобное вещество желто-янтарного цвета, липкое на ощупь, со слабым сосновым запахом. Токсафен легко растворим в органических растворителях, плохо — в воде.

Токсафен является инсектицидом широкого спектра действия, используется в сельском хозяйстве, особенно при выращивании хлопчатника и сои, а также при уничтожении паразитов крупного рогатого скота и других домашних животных.

Аналогично другим летучим пестицидам токсафен способен распространяться по воздуху, поэтому его можно *обнаружить в воздухе и почвах тех мест, где он ранее не использовался*. Содержание токсафена в воздухе в некоторых местах зависит от сезона. В почвах токсафен относится к одним из самых распространенных ХОП.

Концентрации токсафена в организмах, обитающих *в водной среде*, высоки во всем мире: в рыбах залива Святого Лаврентия (Канада) содержание токсафена составляет 28 мг / кг жира, в рыбах Балтики — 6 мг / кг жира, форели Великих озер США — 25–30 мг / кг жира, сельди Северного моря — 1–4 мкг / кг сырого веса, в китах залива Святого Лаврентия — 23 мг / кг, в дельфинах Северного моря — 19 мг / кг сырого веса.

В организм человека токсафен в основном попадает с рыбой. Люди, питающиеся рыбой, могут получить в день 2,8–5,6 нг токсафена на 1 кг массы тела. В последнее время токсафен обнаружен *в грудном молоке* женщин Швеции, Финляндии, Нидерландов (0,05–0,07 мг / кг жира) и Никарагуа (до 68 мг / кг жира).

Токсафен хорошо сохраняется в окружающей среде. Период его полураспада в почве составляет от 2 мес до 10 лет.

Токсафен является канцерогеном для большинства теплокровных животных и человека, нейро-, гепато-, нефро-, гематотоксикантом. В настоящее время он запрещен для применения во всех странах.

Пиретрины и синтетические пиретроиды

Пиретрины — инсектициды, содержащиеся в некоторых видах ромашки рода пиретрум.

Пиретрины **—** смесь сложных эфиров (+)-*транс*-хризантемовой и (+)-*транс*-пиретриновой кислот с замещенным (+)-пиретролоном. Оптически активные *транс*-изомеры этих соединений — бесцветные высококипящие жидкости, легко гидролизуются щелочью, устойчивы в слабокислой среде, разлагаются на воздухе при действии света и влаги.

LD~50 ~пиретринов для крыс при пероральном приеме составляет 200–2600 мг / кг. Действующие вещества и общая формула пиретрума приведены в табл. 7-17 и на рис. 7-8 соответственно.

Таблица 7-17. Действующие вещества пиретрума

Вещество	R~1~	R~2~

Пиретрин I	–CH~3~	–CH=CH~2~
Пиретрин II	–OCOCH~3~	–CH=CH~2~
Цинерин I	–CH~3~	–CH~3~
Цинерин II	–OCOCH~3~	–CH~3~
Жасмолин I	–CH~3~	–CH~2~–CH~3~
Жасмолин II	–OCOCH~3~	–CH~2~–CH~3~

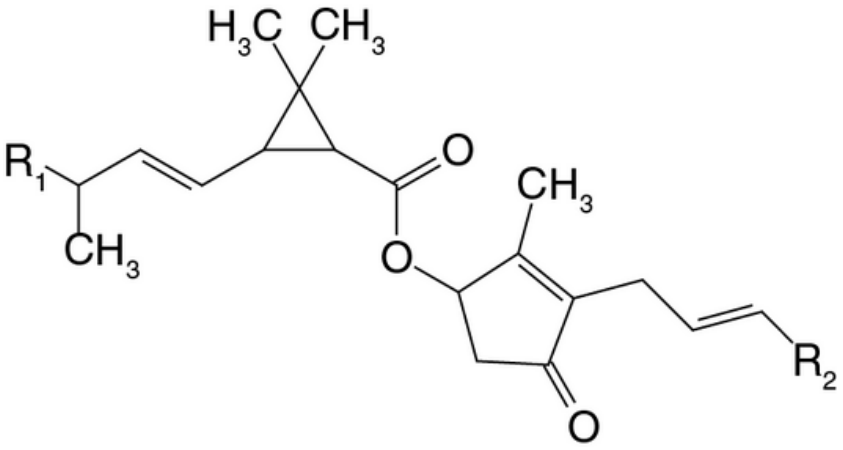


Рис. 7-8. Структурная формула пиретрума

Получают пиретрины экстракцией измельченных цветков ромашки (пиретрума) смесью полярных и неполярных растворителей, реже одним каким-либо растворителем, например дихлорэтаном или другими хлорированными углеводородами. Сопутствующие вещества удаляют осаждением, адсорбцией на угле или вымораживанием с последующей фильтрацией.

Технический 25% экстракт содержит 10% пиретрина I, 9% пиретрина II, 3% цинерина I, около 3% цинерина II и следы жасмолинов. Смесь представляет собой желтое масло, нерастворимое в воде, растворимое в большинстве органических растворителей. Соотношение компонентов в смеси и токсичность для теплокровных животных могут изменяться в зависимости от сорта цветков, условий роста растения, обработки во время экстрагирования или отгонки растворителя.

Пиретрины — *контактные инсектициды* с быстрым парализующим действием (нокдаун-эффект). Применяются в форме аэрозолей, дустов, эмульсий для борьбы с бытовыми насекомыми (клопы, вши, тараканы). Могут использоваться для уничтожения вредных насекомых в сельском хозяйстве и при обработке запасов, однако их действие очень кратковременно. Из-за нестабильности состава к ним редко возникает резистентность. Инсектицидное действие усиливается при добавлении различных веществ-синергистов (пиперонилбутоксид, тропиталь, сезамекс и др.). Препараты на основе перитринов имеют высокую стоимость, что обусловливает их ограниченное использование.

Пиретроиды (синтетические эфиры хризантемовой кислоты) — аналоги пиретринов Их получают взаимодействием хлорангидрида хризантемовой кислоты с соответствующими спиртами в присутствии третичных аминов или переэтерификацией этилового эфира хризантемовой кислоты в присутствии натрия.

Наиболее токсичные для насекомых соединения найдены среди эфиров циклопентенолонов, замещенных бензиловых спиртов и N-оксиметилимидов.

На основе синтетических пиретроидов производят препараты:

* аллетрин — 2-аллил-3-метил-2-циклопентен-4-ол-1-онилхризантемат; * бартрин — 6-хлоро-пиперонилхризантемат; * диметрин — 2,4-диметилбензилхризантемат; * неопинамин — N-(3,4,5,6-тетрагидрофтальимидо) метилхризантемат; * фуретрин — 2-фурфурил-3-метил-2-циклопентен-4-ол-1-онилхризантемат; * циклетрин — 2-циклопентенил-3-метил-2-циклопентен-4-ол-1-онилхризантемат.

Используют и *другие синтетические пиретроиды*: альфаметрин (фастак), дельтаметрин (дельтацид, биорин, децис), перметрин (амбуш, висметрин), циперметрин (цимбуш, ровикил, циперкил, циткор), фенвалерат (сумицидин, фенакс, фенаксил). Их применяют в основном для борьбы с бытовыми насекомыми, обычно в виде аэрозолей.

Триазиновые производные

В качестве почвенных гербицидов системного и контактного действия используют производные 1,3,5,-триазина: аметрин, атразин, метазин, пропазин, симазин и другие препараты, а также их смеси.

Сохраняемость триазинов в почве колеблется в широких пределах: более устойчивы в почве хлорсодержащие триазины (симазин, атразин и пропазин), быстрее разрушаются метилтиопроизводные.

Специфика действия препаратов обусловлена их строением и физико-химическими свойствами. На рис. 7-9 приведена структурная формула одного из гербицидов этого класса.

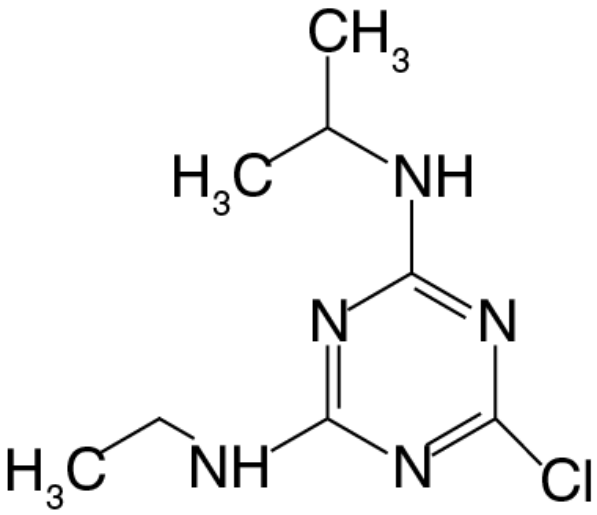


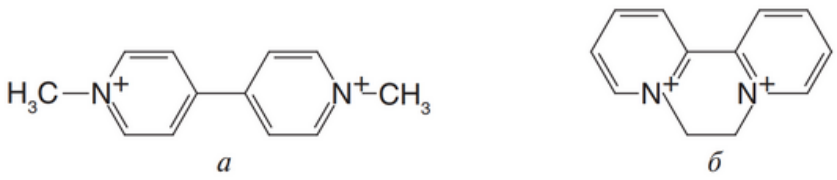
Рис. 7-9. Структурная формула атразина

При *биотрансформации* триазинов происходит моно- или ди-N-деалкилирование. Исходное вещество и N-деалкилированные метаболиты подвергаются меркаптеновой конъюгации и выводятся с мочой.

Прием внутрь около 100 г атразина может привести к коме, коллапсу, метаболическому ацидозу, желудочному кровотечению, почечной недостаточности, некрозу гепатоцитов, нарушению свертываемости крови и смертельному исходу. В случаях острых отравлений рекомендуется проведение гемодиализа.

Производные бипиридила (паракват и дикват)

Паракват и *дикват* — четвертичные аммониевые соединения, применяемые в качестве гербицидов контактного действия (рис. 7-10). По химическим характеристикам дикват аналогичен параквату, но характер его токсического действия на человека несколько иной.



а *б*

Рис. 7-10. Структурные формулы параквата (*а*) и диквата (*б*)

Эти соединения применяются в виде солей (паракват — в виде хлорида и сульфата, дикват — в виде дибромида) как самостоятельно, так и в смеси друг с другом или другими гербицидами.

В незначительной степени эти вещества могут проникать через неповрежденную кожу и слизистые оболочки, однако в большинстве случаев отравления обусловлены приемом параквата (или диквата) внутрь. *При приеме внутрь* их абсорбция в основном осуществляется в *тонкой кишке*. Всасывается примерно 10% принятой дозы, паракват накапливается в легких (дикват не накапливается), оба накапливаются в почках.

Биотрансформация параквата осуществляется при участии дегидрогеназ с образованием АФК. Установлено, что паракват захватывается альвеолоцитами, а затем в них начинается цикличный процесс НАДФ^+^ / НАДФН-зависимого восстановления и окисления с образованием катиона параквата и АФК, которые повреждает клеточные мембраны (см. гл. 3).

До 90% параквата выводится из организма в первые 2 ч.

Отравление паракватом приводит к почечной недостаточности и прогрессирующему легочному фиброзу, что может вызвать смерть от остановки дыхания *через 2–3 нед после отравления.*

Смерть обычно наступает при концентрации параквата в плазме более 0,2 и 0,1 мг / л через 24 и 48 ч соответственно после поступления токсиканта в организм.

Дикват — *токсикант раздражающего действия*, вызывает рвоту, диарею и боль в эпигастральной области. В серьезных случаях возникают печеночная и почечная недостаточность, судороги и кома, но отравление дикватом не приводит к прогрессирующему легочному фиброзу. В случаях смертельных отравлений дикватом его концентрация в плазме составляет 0,45–4,5 мг / л.

Другие группы

Кумариновые антикоагулянты

Кумариновые родентициды ингибируют активность ферментов синтеза витамина K в печени млекопитающих, в том числе человека. В результате нарушается синтез витамин K-зависимых факторов свертывания крови [факторов II (протромбина), VII, IX и X]. Антикоагулянтное действие является дозозависимым и проявляется, когда уровень факторов свертываемости в крови снижается примерно до 20% нормального. Для оценки степени воздействия кумаринов (блокирования цикла витамина K) определяют предшественники факторов коагуляции в крови.

Случайное или намеренное употребление *внутрь* 4-гидроксикумариновых родентицидов может привести к серьезному отравлению, которое проявляется внутренними кровотечениями. Лечение заключается в назначении витамина K, а при тяжелых отравлениях показано переливание крови или введение очищенных факторов свертываемости в количестве, необходимом для восстановления времени свертывания крови до нормальных значений.

Отравление считается сильным при концентрации токсиканта в сыворотке крови 5 мг / л, но для некоторых производных, например ацекумарола и броцифакума, токсическое действие проявляется при значительно более низких концентрациях.

Производные мочевины

Большинство производных мочевины являются почвенными гербицидами. Ассортимент гербицидных препаратов этого класса достаточно широк (глин, тенoран, малоран, лиронион и др.). В растениях и почве они подвергаются сложным превращениям, приводящим к их разрушению и инактивации. Не описано ни одного случая тяжелого отравления человека пестицидами этого класса.

Нитрофенолы и нитрокрезолы

Отравления динитрофенолом, динитрокрезолом и диносебом приводят к *разобщению процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях*, проявляются сильной головной болью, тахикардией, повышением температуры тела, обильным потоотделением.

Головная боль и недомогание отмечаются при концентрации в крови токсикантов этой группы около 40 мг / л, значительная интоксикация наблюдается при концентрации динитрокрезола 44–60 мг / л.

При отравлении динитрофенолом со смертельным исходом его концентрация в крови была 75 мг / л.

Хлорированные феноксикислоты

Пестициды на основе хлорфеноксикислот относятся к гербицидам. Наиболее широко используются 2,4-дихлорофеноксиуксусная (2,4-Д), 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная (2,4,5-Т) и 2-метил-4-хлорфеноксиуксусная (МХФУ) кислоты.

Эти средства быстро разрушаются в окружающей среде, но *практически не подвергаются биотрансформации* в организме млекопитающих. Более 95% 2,4-Д, 2,4,5-Т и МХФУ после абсорбции в ЖКТ выводятся из организма человека *в неизмененном виде* с мочой в течение 5 дней. В мониторинге воздействия этих гербицидов на производстве используется измерение содержания неизмененных соединений в моче. При обследовании лиц, подвергшихся воздействию малых доз токсикантов на производстве, были определены их концентрации в моче: 0,10–8 мг / л для 2,4-Д, 0,05–4,5 мг / л для 2,4,5-Т и менее 0,1–15 мг / л для МХФУ.

Хлорированные феноксикислоты повреждают *кожу, глаза, дыхательную систему и ЖКТ*. Преднамеренный или случайный прием внутрь больших доз токсикантов вызывает рвоту, боли в желудке и кишечнике, диарею, метаболический ацидоз, отек легких и кому. Начальная концентрация 2,4-Д в плазме крови пациента, выжившего после приема 7 г вещества, составила 400 мг / л. В другом, несмертельном случае отравления максимальная концентрация 2,4-Д в плазме была 1031 мг / л. Однако, как правило, концентрация 2,4-Д в крови 58–826 мг / л приводит к смертельному исходу.

Эффективная терапия заключается в ощелачивании мочи с целью увеличения выведения 2,4-Д и других соединений класса хлорфеноксикислот.

Особую опасность представляет *производство этого класса пестицидов*. При промышленном получении трихлорфенола, предшественника гексахлорофена и 2,4,5-Т в качестве побочного продукта образуется *2,3,7,8-тетрахлородибензо-п-диоксин* (2,3,7,8-ТХДД, тетрадиоксин). Это одно из *самых токсичных синтетических веществ*, известных в настоящее время.

Диоксины — наиболее токсичные представители класса хлорорганических соединений (рис. 7-11), поражающие печень, нервную, эндокринную и иммунную системы. Диоксины обладают канцерогенным и тератогенным свойствами.

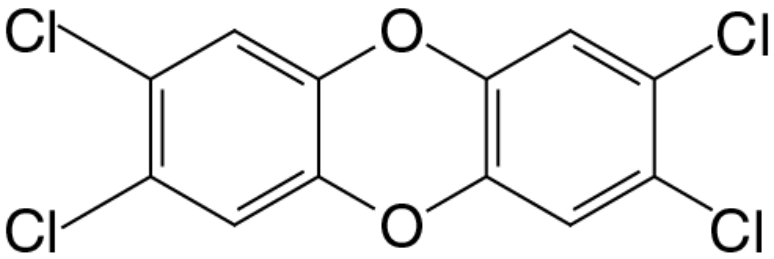


Рис. 7-11. Структурная формула 2,3,7,8-тетрахлородибензо-*п*-диоксин

Диоксины относятся к группе химических веществ, имеющих повсеместное распространение, высокую стойкость, способность перемещаться на значительные расстояния, а также накапливаться в живых организмах и окружающей среде (см. гл. 9).

Диоксины — сильнолипофильные соединения, имеющие тенденцию к кумуляции в жировой ткани организма, стабильны в окружающей среде. Высокие концентрации диоксинов обнаруживаются в поджелудочной железе и печени. Основной путь экскреции — с калом.

Металлоорганические соединения и неорганические соединения металлов

Пестициды этой группы используются как акарициды (органотин), гербициды (органические соединения мышьяка), фунгициды (дитиокарбаматные комплексы марганца, никеля и цинка, металлоорганические соединения ртути и неорганические соединения меди), родентициды (фосфиды магния, алюминия и цинка, сульфат таллия). Химическая природа и токсичность представителей этой группы весьма разнообразны (см. п. 7.5).

Например, *неорганические соединения олова* относительно безвредны, *оловоорганические соединения* (этил-, бутил- или фенилпроизводные), используемые главным образом как моллюстициды, представляют серьезную опасность из-за высокой растворимости в липидах, которая является причиной их проникновения в ЦНС. Это может привести к частичному параличу, расстройствам зрения и психики, судорогам и смерти от остановки сердца или дыхания.

Прием внутрь *неорганических соединений ртути* вызывает расстройства деятельности ЖКТ (рвота, диарея) и почечную недостаточность, в то время как растворимые в липидах *органические соединения ртути* (диметилртуть или диэтилртуть) накапливаются в ЦНС и приводят к атаксии, судорогам, параличу и смерти.

Отравление *солями таллия* вызывает повреждение сердечно-сосудистой, иммунной, дыхательной систем, а также периферической и центральной нервной системы. Характерный признак отравления таллием — выпадение волос через 1–2 нед после интоксикации. Наиболее надежная диагностическая процедура — определение таллия в сыворотке крови, моче и обязательно в волосах (см. п. 7.5).

Фосфин

Фосфин используют как инсектицид или родентицид. Обычно фосфин получают в результате действия воды на фосфиды металлов (алюминия, магния и цинка). При поступлении внутрь фосфидов металлов фосфин образуется в желудке и действует на пищеварительную и центральную нервную системы. При сильном отравлении симптомы развиваются быстро — в течение 2 ч появляются боль в животе, рвота, судороги, кома, весьма вероятен летальный исход. Описан случай смертельного отравления мужчины фосфидом алюминия, при котором концентрация фосфина в крови составила 0,5 мг / л, в печени — 3 мкг / кг.

7.4.3. Методы определения

Истина — это не то, что можно доказать,
это то, чего нельзя избежать.

Антуан де Сент-Экзюпери (1900–1944),
французский писатель, поэт,
философ, профессиональный летчик

Доступны и широко используются тысячи пестицидов. Большие запасы устаревших пестицидов, которые перестали выпускаться в промышленном масштабе, хранятся на складах и их продолжают применять. Для окружающей среды, человека и животных пестициды, несомненно, представляют опасность.

Широкий ассортимент различающихся по своим свойствам веществ делает задачу их определения чрезвычайно сложной. С этой целью применяют иммунохимические и хроматографические методы. Объектами исследования являются различные коммерческие препараты, продукты домашнего приготовления, косметика, вода, напитки, пища, объекты окружающей среды, образцы биологических жидкостей и тканей.

Пробоподготовка

Разнообразие химических классов пестицидов и их свойств, характера объектов исследования (почва, вода, воздух, пищевые продукты, биологические образцы и т.д.), особенности методов определения влияют на выбор способа пробоподготовки (см. гл. 4). В этом разделе будет рассмотрена пробоподготовка только биологических объектов.

Гидролиз конъюгатов пестицидов и их метаболитов с глюкуроновой, серной или другими кислотами (иными субстратами) часто является одной из стадий пробоподготовки биообразцов. Предпочтительный способ гидролиза конъюгатов пестицидов и их метаболитов — *ферментативный гидролиз,* который обычно осуществляется с применением β-глюкуронидазы и β-арилсульфатазы в течение 12 ч при 37 °C.

Экстракция из биологических жидкостей осложнена тем, что некоторые пестициды легко разрушаются кислотами или щелочами. Продукты разложения ряда пестицидов, например производных мочевины, могут вступать во взаимодействие с некоторыми растворителями, например этанолом или ацетоном.

Пестициды изолируют из водной среды, применяя ЖЖЭ или ТФЭ.

ЖЖЭ расценивается как более универсальный способ для *скрининга*, в то время как ТФЭ предпочтительна для проведения *количественного определения* ряда пестицидов в образцах крови или *извлечения* пестицидов определенного химического класса, таких как кумариновые антикоагулянты или четвертичные аммониевые основания. В последние годы ТФЭ используют чаще.

Использование для ЖЖЭ растворителей, различающихся *по своей природе* и полярности, позволяет получать извлечения с наименьшим количеством соэкстрактивных веществ. Так, при извлечении ФОП из тканей органов трупа с помощью гексана или петролейного эфира, смесей гексана и ацетона (в соотношении 90:10 и 70:30 соответственно) получают извлечения с наименьшим числом соэкстрактивных веществ. Использование в качестве экстрагентов ацетонитрила, бензола, хлороформа, метанола, этанола значительно увеличивает массу и число экстрактивных веществ.

Твердые образцы гомогенизируют с равной массой воды. Пищевые продукты, содержимое желудка, особенно с неусвоенными остатками пищи, или ткани желудка, гомогенизированные с водой, смешивают с насыщенным раствором кальция хлорида, оставляют на ночь и фильтруют.

Фильтрованный образец или гомогенат в количестве 5–10 мл встряхивают 5 мин с равным объемом смеси гексан–толуол (1:1 по объему). Органический слой отделяют центрифугированием и сохраняют; pH водной фракции доводят до 2,0 добавлением 1 М серной кислоты и затем извлекают равным объемом диэтилового эфира. Водную фазу сохраняют для дальнейшего исследования.

Толуол-гексановое и эфирное извлечения объединяют и затем разделяют на равные части. Каждую часть выпаривают досуха при 40 °С в токе азота. Первый сухой остаток растворяют в 50 мкл толуола или гексана. Аликвоту от 5 до 10 мкл помещают на пластину для ТСХ, аликвоту от 1 до 2 мкл подвергают анализу методами ГХ или ГХ-МС. Два других остатка и водную фазу сохраняют для дериватизации и/ или дополнительных испытаний, которые могут быть частью процедур подтверждения или скрининга.

Для очистки *экстрактов*, содержащих пестициды, от балластных веществ применяют различные способы. На 1-м этапе очистки одним из простых способов является *вымораживание*. На последующих этапах применяют *экстракционную очистку, хроматографические методы:* препаративную ТСХ, колоночную хроматографию, гельпроникающую или флеш-хроматографию.

Для выделения пестицидов и удаления мешающих примесей также применяют *ультразвуковую, микроволновую, иммуноаффинную*, *сверхкритическую флюидную экстракцию* (СФЭ) *и др.* (см. гл. 4).

СФЭ *селективна* и позволяет использовать небольшие объемы растворителя. Сверхкритические жидкости имеют плотность, близкую к плотности обычных жидкостей, но меньшую вязкость и высокий коэффициент диффузии. Автоматизация процесса позволяет проводить экстракцию и очистку быстро и в один этап. Хорошие результаты получены *для полярных* и *малополярных пестицидов*.

В последние годы усиленно развивается метод *микроволновой экстракции*. Он основан на использовании энергии микроволнового излучения и имеет ряд преимуществ перед другими методами экстракции. Микроволновая экстракция позволяет количественно извлекать органические соединения из матрицы за 10–15 мин с использованием минимальных количеств органических растворителей (2–10 мл растворителя на 1 г образца).

Решить проблему многостадийной пробоподготовки и повысить точность анализа можно с помощью *иммуноаффинной хроматографии*, основанной на биоспецифических взаимодействиях с использованием иммуносорбентов.

Некоторые пестициды (например, ГХЦГ) из тканей органов можно изолировать перегонкой с водяным паром.

Дериватизация пестицидов. Газохроматографическое исследование многих пестицидов требует проведения дериватизации, которая не только улучшает хроматографическое разделение, но для многих веществ обеспечивает возможность использовать этот метод. Кроме того, в некоторых случаях хроматографический анализ извлечения *до и после проведения дериватизации* увеличивает эффективность идентификации методом ГХ, а для методов ГХ-МС изменения в картине фрагментации могут давать дополнительную информацию об исследуемом веществе.

Предварительное исследование пестицидов проводят хроматографическими методами (ТСХ и ГХ) или ИХМ.

ТСХ применяют для скрининга и идентификации пестицидов в коммерческих *препаратах*, добавленных к напиткам или пищевым продуктам, *биологических жидкостях (содержимое желудка, моча) и тканях.*

Исследования образцов *крови, объектов окружающей среды* на наличие остаточных количеств пестицидов требует применения более чувствительной техники ГХ. Наличие в молекулах пестицидов атомов фосфора, галогенов, сурьмы или мышьяка позволяет использовать возможности селективных газохроматографических детекторов (АФД, ЭЗД, пламенно-фотометрический — ПФД), а также газохроматографических систем, способных одновременно получать сигналы от нескольких из указанных детекторов или оборудованных современными устройствами для переключения потоков между хроматографическими колонками разной полярности (многомерная хроматография).

В последние годы разрабатывается скрининговый анализ пестицидов *с* использованием ИМХ. Лидирующее положение среди таких методов определения пестицидов занимает гетерогенный твердофазный ИФА, технология ELISA. Для определения пестицидов также успешно применяется метод ПФИА.

Тонкослойная хроматография

Один из наиболее простых и распространенных методов определения пестицидов — ТСХ. При исследовании пестицидов используют пластины с силикагелем, реже с оксидом алюминия. Подвижной фазой могут быть однокомпонентные системы растворителей (гексан, бензол, хлороформ, ацетон и др.), но для разделения смесей пестицидов и идентификации их по величинам *R~f~* наиболее результативны двух- и трехкомпонентные системы растворителей на основе гексана и толуола с добавлением полярных растворителей (ацетон, хлороформ, бензол, диэтиловый эфир, этилацетат). Целесообразно применение многокомпонентных систем, например, для разделения смесей синтетических пиретроидов.

При проведении ХТА *для скрининга пестицидов регламентировано* применение хроматографических систем: силикагель 60 F~254~, система растворителей гексан–ацетон (80:20) или толуол–ацетон (95:5), проявляющие реагенты.

Универсальными, *но неселективными реагентами* являются иод, раствор перманганата калия, раствор дихромата калия, исследование в УФ-свете (пластины с флуоресцирующим индикатором).

Обнаружение ХОП: после опрыскивания хроматограмм раствором аммиаката серебра в ацетоне и последующего облучения УФ-светом такие пестициды проявляются в виде темных пятен (используют и другие реакции).

Алкилтиопроизводные симметричного триазина при действии этого реагента (в результате образования хелата серебра) обнаруживают в виде белых пятен на сером фоне хроматограммы.

Соединения, содержащие донорные атомы серы, кислорода, азота (*синтетические пиретроиды, ФОП, симметричные триазины, тиокарбаматы и др*.) детектируют реакцией с бромфеноловым синим (реакция неизбирательна).

Для обнаружения *синтетических пиретроид*ов, содержащих цианогруппу (фенвалерат, циперметрин, дельтаметрин) и способных освобождать цианид-ион при щелочном гидролизе, проводят реакцию с ацетатом меди и *о*-толуидином (синее окрашивание).

Обнаружение некоторых *карбаматов* возможно по реакции азосочетания после их превращения в производные ароматических аминов. При введении цинка (необходимого для восстановления) в состав адсорбционного слоя,

а кислоты — в проявляющий реагент реакция образования красителя происходят непосредственно в тонком слое сорбента.

Подробное описание методик определения пестицидов с помощью ТСХ с указанием хроматографических систем, способов приготовления проявляющих реагентов и их использования можно найти в соответствующей литературе.

Газовая хроматография

Метод обладает высокой чувствительностью, поэтому широко и успешно применяется для обнаружения и количественного определения микроколичеств пестицидов в пищевых продуктах растительного и животного происхождения, различных объектах окружающей среды, технических препаратах, биообразцах.

Применение метода может ограничиваться *низкой летучестью* и *термической нестабильностью* некоторых пестицидов. Эффективность ГХ определяется типом и режимом работы детектора, характером разделительной колонки, свойствами хроматографируемых соединений, используемой аппаратурой.

Исследование проводят *на капиллярных колонках с различающимися по полярности неподвижными жидкими фазами*. Выбор неподвижной жидкой фазы для решения каждой конкретной задачи требует индивидуального подхода. Для определения пестицидов часто используют ЭЗД, ТИД, АФД, ПФД, ПИД и др.

Выбор детектора зависит от цели анализа и условий его выполнения.

Для определения ХОП применяют преимущественно ЭЗД, чувствительный и селективный к галогенсодержащим соединениям, сульфидам, соединениям с сопряженными двойными связями и некоторым другим веществам, содержащим атомы с высокой электроотрицательностью (по шкале Полинга).

При определении фосфорсодержащих соединений используют высокоселективные и чувствительные к фосфор- и азотсодержащим органическим соединениям ТИД, АФД, ПФД и ПИД.

Газовая хроматография с масс-селективным детектором

Системы ГХ-МС сопровождаются библиотеками, которые содержат спектры многих пестицидов, их метаболитов и продуктов разложения.

В настоящее время разработано несколько комплексных систем обнаружения и количественного определения различных пестицидов методом ГХ-МС. Многие из них используют самые современные методы математической обработки получаемой информации, включающей методы *деконвалюции хроматографических пиков*, реализованные в программе AMDIS Национального американского института стандартов (NIST) с последующей обработкой хемометрическими методами распознавания образов. Данная система позволяет проводить исследование более 500 пестицидов разных химических классов в различных объектах.

Высокоэффективная ЖХ

Для определения пестицидов ВЭЖХ менее эффективна, чем газовая хроматография, так как имеет *меньшую чувствительность* для большинства веществ и их времена удерживания *менее воспроизводимы*. Однако ВЭЖХ применяется для количественного определения пестицидов, а также для проведения подтверждающих исследований, особенно при наличии МС-детектора. Современные способы подготовки образцов (ТФЭ и ЖЖЭ при сверхкритических условиях) дают возможность повысить чувствительность определения до уровней нанограммов на 1 кг или 1 л.

Преимущество этого метода заключается в том, что нелетучие и водорастворимые пестициды можно определять на современных жидкостных хроматографах *без дериватизации*. Поскольку разделение и регистрация пиков производятся при комнатной (или слегка повышенной) температуре, этот метод подходит для работы с веществами, малоустойчивыми при нагревании.

При проведении ВЭЖХ используют главным образом силикагели немодифицированные и модицированные С18 или другие, например цианмодифицированные сорбенты. В качестве подвижных фаз применяют смеси

ацетонитрила с водой и другие аналогичные им смеси. Выбор неподвижной и подвижной фаз сильно зависит от свойств исследуемых веществ и используемого оборудования (см. п. 5.3.4).

В последние годы для определения пестицидов в различных объектах применяют КЭФ с МС-детектором — КЭ-МС.

Арбитражным методом при определении пестицидов считают ГХ-МС.

Концентрация пестицидов в биообъектах, взятых от пациентов с острыми отравлениями, определяет адекватный выбор методов детоксикации и лечения, особенно когда рассматривается необходимость применения форсированного диуреза или гемодиализа. При смертельных отравлениях (в случаях убийств или самоубийств) концентрация пестицидов в исследуемых объектах (биообразцы, напитки, пища, одежда, почва и др.) может быть достаточно высокой, что облегчает идентификацию конкретного пестицида. Количественное определение этого вещества в тканях трупа позволяет доказать, что отравление вызвано именно этим пестицидом.

Количественное определение используют для мониторинга концентрации пестицидов в почве, источниках воды, реках, озерах и пищевых продуктах; в некоторых странах введен законодательный контроль над допустимым уровнем пестицидов в окружающей среде.

«Пестициды отчасти при неправильном использовании и хранении, а отчасти из-за отсутствия достоверных научных данных об их влиянии на человека и окружающую среду превращаются в химические бумеранги, которые запускаются химиками для позитивного решения конкретных проблем, но на второй половине петли возвращаются по трофическим цепям в живые организмы, биоаккумулируются в них и вызывают серьезные химические стрессы» (В. С. Петросян, химический факультет МГУ).

7.5. Токсичные и эссенциальные элементы

Нет вопросов более важных,
чем вопросы о загадке жизни.

Владимир Иванович Вернадский (1863–1945),
выдающийся российский и советский
ученый-естествоиспытатель,
создатель науки биогеохимии,
мыслитель и общественный деятель

7.5.1. Главные факторы токсичности элементов. Металлолигандный гомеостаз

Можете мне поверить:
по-настоящему
навредить себе способны только мы сами.

Сэмюэль Джонсон (1709–1784),
английский поэт и литературный
критик эпохи Просвещения

Большинство организмов, включая человека, имеют различные биологические механизмы для противодействия потенциально вредному уровню (избыточному или недостаточному) элементов.

Поддержание гомеостаза связано с изменениями протеома (см. гл. 2), однако значительная часть белковых молекул, являющихся ферментами, содержат в составе активного центра катионы металлов, в значительной степени определяющих биологическую активность белков. Помимо этого, сигнальная функция металлов обусловлена их влиянием на различные метаболические пути и связыванием с определенными лигандами белковой природы. Достижения в области метаболомики подтверждают роль металлопротеома в поддержании гомеостаза. Стабильный уровень внутриклеточных металлов является важнейшим фактором клеточного гомеостаза.

В настоящее время доказана роль макро- и микроэлементов в процессах роста, дифференцировки, репарации и регенерации, апоптоза, некроза, выживаемости клеток, а также в патогенезе хронических воспалительных, дегенеративных и ряда других заболеваний.

В организме человека обнаружено более 80 химических элементов. В качестве шкалы содержания элементов (металлов и неметаллов) в организме принято придерживаться следующих дефиниций:

* макроэлементы: H, O, C, N, P, S, Cl, Ca, K, Na, Mg, Fe; * микроэлементы: Zn, F, Sr, Mo, Cu, Br, Si, Cs, I, Mn, Al, Pb, Cd, B, Rb, Se, Hg, V, As, Li, Ba, Ti, Sn; * ультрамикроэлементы: Co, Cr, Ni, Ag, Be, Ga, Ge, Sc, Zr, Bi, Sb, U, Th, Rh.

Микроэлементы и ультрамикроэлементы (МЭ) — группа химических элементов, которые содержатся в животных и растительных организмах в количестве 10^–3^–10^–10^%. Они распределены в тканях и жидкостях организма неравномерно.

Особенность функционирования химических элементов в организме заключается в их взаимодействии друг с другом, которое проявляется *синергическими* или *антагонистическими эффектами* (рис. 7-12).

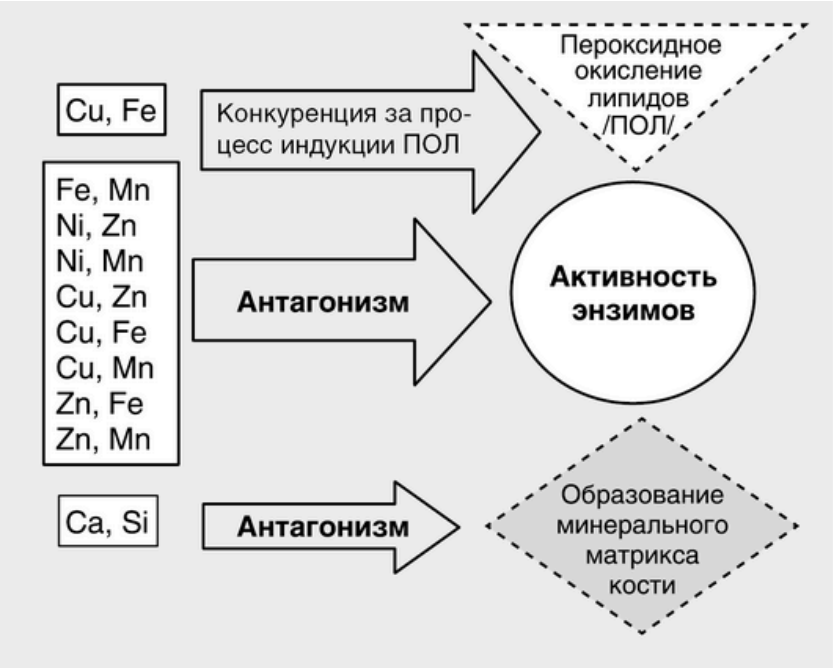


Рис. 7-12. Синергическое и антагонистическое влияние элементов на различные биохимические процессы и физиологические показатели

Изученные к настоящему времени двух-, трех- и многосторонние взаимосвязи между химическими элементами в организме исчисляются сотнями. Синергические и антагонистические механизмы функционируют на уровне тканевого и клеточного метаболизма. Существуют пары и триады элементов, оказывающие синергическое или антагонистическое влияние на различные биохимические процессы и физиологические показатели, например, пары Fe / Mn, Fe / Zn, Zn / Cu, Cd / Cu, Cu / Mo и др., триады (I~2~, Ca, PO~4~^3–^), (Mo, Cu, SO~4~^2–^).

Каждый элемент имеет диапазон безопасной экспозиции (рис. 7-13). В то же время в зависимости от токсичности или эссенциальности, а также содержания элемента в организме (макро- или микроэлемент) диапазон характеризуется значительной вариабельностью. Так, диапазон безопасной экспозиции магния (эссенциальный макроэлемент) или цинка (эссенциальный микроэлемент) существенно превышает таковой для селена и кобальта, которые также являются эссенциальными МЭ. Согласно современным представлениям, диапазон безопасной экспозиции для токсичных металлов не рассматривают, даже несмотря на отсутствие видимых отрицательных эффектов на биологические системы в низких концентрациях.

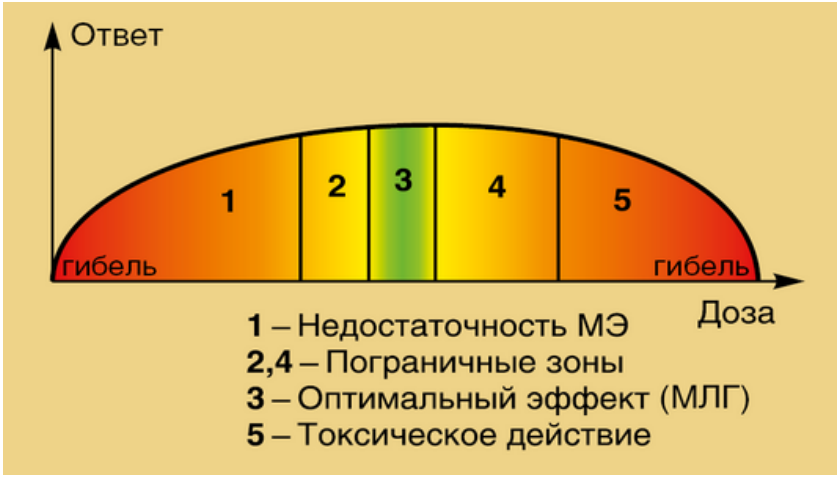


Рис. 7-13. Каждый элемент имеет диапазон оптимальных концентраций, обеспечивающий нормальную жизнедеятельность организма. МЛГ — металлолигандный гомеостаз

Мышьяк, свинец, ртуть, кадмий входят в первые 10 ранговых мест перечня 275 ранжированных по степени опасности химических соединений (Агентство по регистрации токсичных субстанций и заболеваний, ATSDR). Кроме указанных элементов, важное токсикологическое значение имеют *марганец, медь, кобальт, никель, таллий, хром* и *цинк.*

Эссенциальность элементов не исключает их токсичности, поскольку в избыточных дозах даже эссенциальные металлы способны превышать возможности физиологических механизмов регуляции их гомеостаза, что приводит к реализации токсического действия. Например, гемохроматоз и болезнь Вильсона–Коновалова, при которых избыточное количество железа и/или меди индуцирует развитие окислительного стресса и других проявлений токсичности, приводя к повреждению клеток и тканей. К эссенциальным МЭ применим известный постулат Парацельса.

*Токсичность элементов не исключает их эссенциальности***.** Эссенциальность является *качественным отличием* (признаком) всех минеральных веществ, алиментарный дефицит или недостаточное поступление которых в течение времени приводят к развитию болезни.

По словам известного советского и российского патолога и физиолога академика А. П. Авцына, микроэлементы — это «скорее всего, не случайные ингредиенты тканей и жидкостей организмов, а компоненты закономерно существующей очень древней и сложной физиологической системы, участвующей в регулировании жизненных функций на всех стадиях развития».

Организм — динамическая полилигандная и полиметаллическая система, для функционирования которой необходимо *поддержание* МЛГ.

Определение количественных изменений компонентов *металлома* — продуктов взаимодействия ионных и атомных форм металлов с эндогенными лигандами (нуклеотидами и нуклеозидами, белками, пептидами и аминокислотами, углеводами и высшими жирными кислотами, витаминами, гормонами и простагландинами), становится реальностью в связи с внедрением новых технологий — метаболомики и метабономики, использующих аналитические системы ВЭЖХ-ИСП-МС, КЭ-ИСП-МС-ЯМР или ВЭЖХ-ИСП-МС-ЯМР (см. гл. 2 и 5).

Обмен, циркуляция, депонирование ионов металлов объясняются их участием *в процессах комплексообразования* как с естественными эндогенными, так и экзогенными лигандами, проникающими в организм из окружающей среды. Процессы, протекающие в организме при участии металлов, несмотря на зависимость от различных факторов, подчиняются глобальному закону химии — закону действующих масс и описываются константами комплексообразования. Бóльшая часть металлов в организме находится в виде хелатов с биологически активными веществами.

Как известно, устойчивость комплекса характеризуется константой устойчивости или обратной величиной — константой нестойкости, что позволяет прогнозировать направление лигандообменных процессов. Конкурирующий

процесс комплексообразования пойдет в направлении получения наиболее прочного комплекса, т. е. с наименьшей константой нестойкости. Объектом конкуренции может быть как металл, так и лиганд. Устойчивость комплексов играет фундаментальную роль во внутри- и внеклеточной динамике, антагонизме, синергизме и фармакодинамическом действии микроэлементов.

Стабильность биокомплексов определяется многими факторами, наиболее важны из них комплементарность, стереоселективность, природа элемента (центрального атома) и лигандов, меж- и внутримолекулярные стабилизирующие и дестабилизирующие взаимодействия, кинетика комплексообразования и др.

Стерические особенности образуемых комплексов способствуют их проникновению через клеточные мембраны и доступности для разнообразных клеточных рецепторов.

Биокомплексы металлов представляют собой уникальную группу соединений, участвующих в поддержании целостности клетки вследствие взаимодействий различной природы и пространственной организации клеточных компонентов.

Комплексы *одного и того же* биолиганда с различными ионами металлов (и наоборот) имеют *различную токсичность*. Это объясняет множественность биологических эффектов эндогенных комплексов.

При определении токсического воздействия металлов (и других элементов, например селена и мышьяка) нужно учитывать уникальные и разнообразные физические и химические свойства этой группы токсикантов (см. п. 7.5.2).

* Металлы не подвержены биотрансформации, что приводит к более выраженному их воздействию на организм, чем у других, менее устойчивых токсичных веществ органической природы. * Способность соединений металлов к ионизации в растворах влияет на их абсорбцию, распределение и выведение. * Существование элементов в окружающей среде, растительном и животном мире в различных химических формах (в виде атомов, ионов, в составе ковалентных, в частности координационных, соединений) обусловливает их различные токсические свойства.

Влияние содержания элементов в организме на *состояние здоровья* человека связано с проблемами:

* элементной недостаточности; * элементной интоксикации; * элементного дисбаланса.

Миллиарды человек страдают заболеваниями, связанными с дефицитом макро- и микроэлементов. Можно ли корректировать элементный статус человека? В настоящее время большое внимание уделяется борьбе с дефицитом в организме отдельных микроэлементов, в первую очередь иода, селена, цинка, а также и железа, но часто такая борьба приносит больше вреда, чем пользы. Например, бороться с *дефицитом иода при недостатке селена* в окружающей среде и пище человека бессмысленно *из-за неусвояемости* в этом случае иода. Кроме того, возникает опасность взаимодействия избыточно введенного иода с другими МЭ: подавляется усвоение селена, железа, цинка и кальция, нарушается их метаболизм, что неминуемо приводит к полимикроэлементозу. Учитывая большую токсичность ионной формы селена и его антагонизм (подавление усвоения) с иодом, фтором, цинком, кальцием и железом, бесконтрольный прием препаратов селена может нанести значительный ущерб здоровью.

Приведем еще один пример. Усвоение железа контролируют одновременно несколько элементов: Ca, F, I, Zn, Cu, Co, Se. Если нет генетически обусловленных нарушений синтеза железосодержащих белков, вызвать дефицит железа сложно. При генетическом нарушении метаболизма железа происходит его усиленное всасывание из пищи, накопление в паренхиматозных органах, что приводит к повреждению последних и развитию, например, наследственного гемохроматоза.

В норме ген *SLC*40*A*1 кодирует белок для экспорта железа — *ферропортин* (FPN1). *Голотрансферрин* связывается с *трансферриновым рецептором* (TfR) на поверхности клетки. Комплекс располагается на выстланных клатрином углублениях, которые инвагинируются внутрь клетки, инициируя эндоцитоз. После формирования специализированной эндосомы при помощи протонной помпы происходит ацидификация ее содержимого, что приводит к изменению конформации белков и обусловливает высвобождение железа из трансферрина. Эти же процессы активизирует *переносчик двухвалентных металлов* (DMT1), при помощи которого железо покидает

эндосому и выходит в цитоплазму. *Апотрансферрин* вместе с трансферриновым рецептором возвращается на поверхность клетки, где в нейтральной среде происходит их диссоциация. Далее цикл повторяется. В большинстве клеток железо запасается в виде *ферритина* и *гемосидерина* (рис. 7-14).

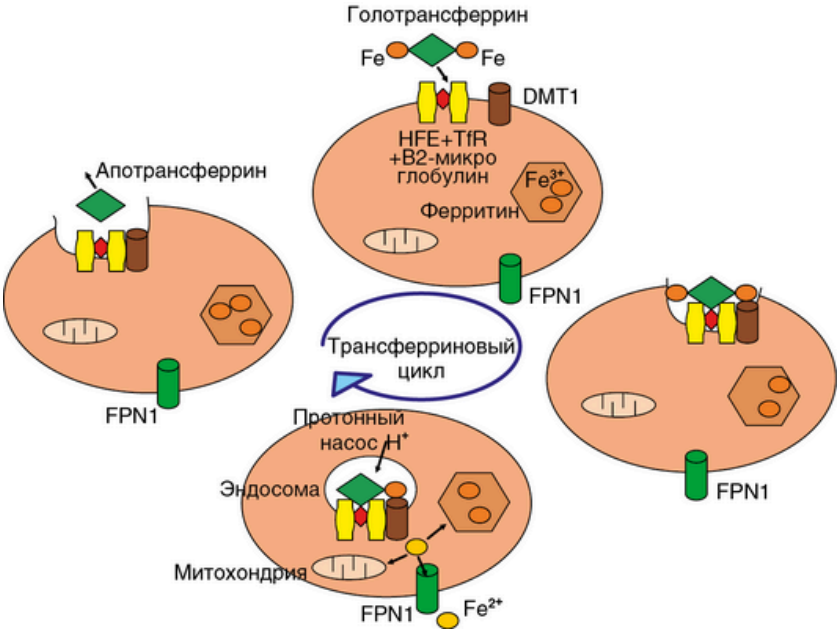


Рис. 7-14. Трансферриновый цикл (по М. Литвиновой). FPN1 — ферропортин 1; HFE — ген наследственного гемохроматоза

К настоящему времени идентифицированы *железоотвечающие элементы* (IRE — iron response element), регулирующие метаболизм железа как в норме, так и при патологии. Эти структуры находятся в мРНК и регулируют трансляцию мРНК трансферринового рецептора на посттранскрипционном уровне. Когда внутриклеточная концентрация железа достаточно высокая, образуются комплексы Fe(II) — *железосвязывающий белок* (IBP), которые не соединяются с IRE, что дестабилизирует мРНК трансферринового рецептора.

Снижение экспрессии рецепторов к трансферрину на клеточной поверхности ограничивает поступление железа. Однако эта модель действует только в диапазоне адаптационных возможностей организма (рис. 7-15).

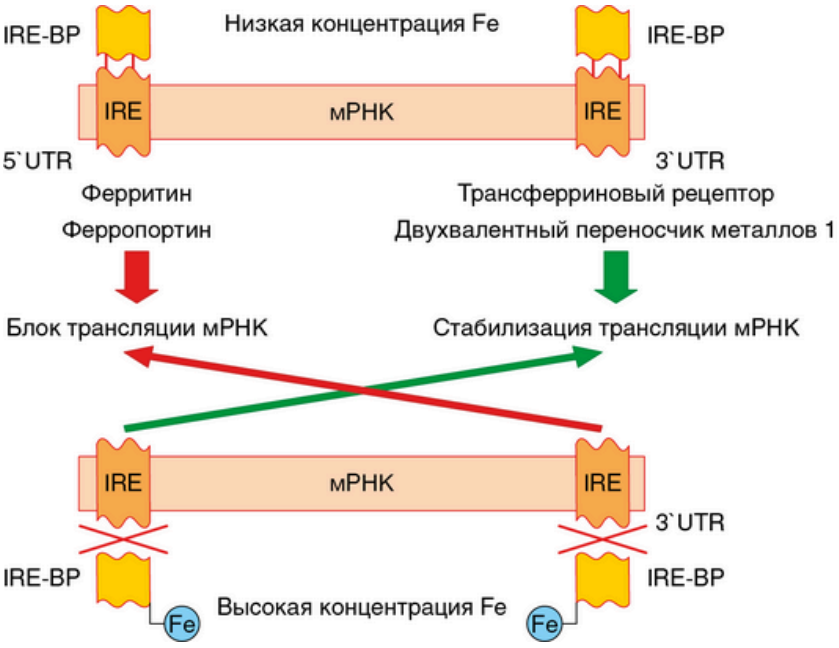


Рис. 7-15. Регуляция трансляции мРНК ферритина, переносчика двухвалентных металлов ДМТ1, рецептора трансферрина и ферропортина в условиях низкой и высокой концентрации железа внутри клетки (по М. Литвиновой). В условиях низкой концентрации железа внутри клетки железосвязывающий протеин (IRE-BP) взаимодействует с железочувствительным элементом (IRE) мРНК на 5’ (5’UTR) — или 3’ (3’UTR)-нетранслируемом

участке. При этом IRE ферритина и ферропортина находятся на 5'UTR, а IRE трансферринового рецептора и двухвалентного переносчика металлов ДМТ1 — на 3'UTR. Связывание IRE-BP с IRE на 5'UTR ведет к блоку трансляции мРНК, связывание на 3'UTR — к ее стабилизации. В условиях высокой концентрации железа взаимодействие Fe с IRE-BP препятствует контактированию последнего с IRE, что соответственно дает противоположный эффект (IBP на рисунке не обозначен)

Активность *ферропортина* регулируется влиянием гормоноподобного белка *гепсидина*, вызывающего его интернализацию и лизосомную деградацию (рис. 7-16). При нормальном функционировании системы регуляции угнетение ферропортина приводит к повышению концентрации железа внутри клетки. Находясь в избытке в недифференцированной клетке крипты кишечника, железо связывается с IRP, что ведет к блоку трансляции DMT1 энтероцита ворсинки. Последнее уменьшает абсорбцию железа пищи в тонкой кишке. Чтобы восстанавливать *пониженное содержание железа,* надо знать *причину* его дефицита. Длительный прием препаратов железа может только ухудшить ситуацию.

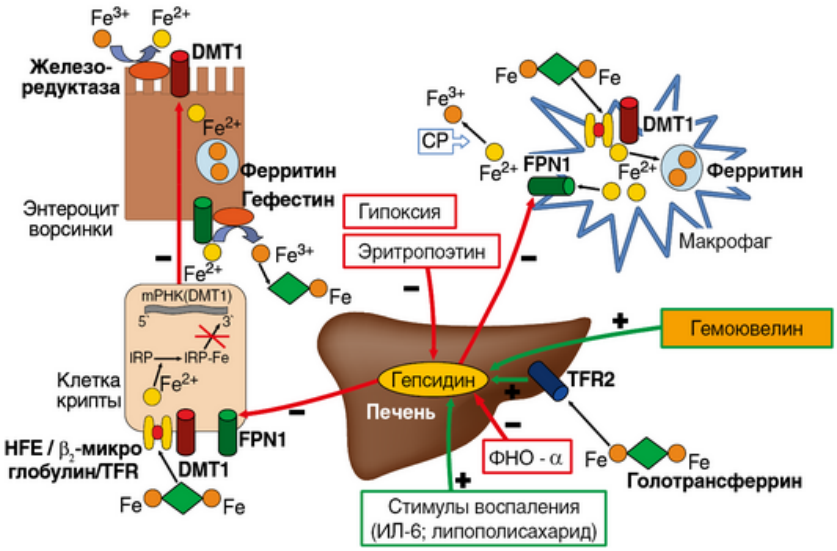


Рис. 7-16. Схема взаимодействия основных компонентов системы регуляции обмена железа (по М. Литвиновой, 2005) (пояснения в тексте)

Восстановление баланса МЭ — очень трудная задача, решить которую можно далеко не всегда с помощью восполнения дефицита или выведения избытка микроэлементов, так как в природе распространены *координированные влияния элементов*.

Механизмы токсичности

В организме реализуются многие пути воздействия МЭ — микроэлементов и ультрамикроэлементов — на клетку:

* влияние на процессы транскрипции и экспрессии белков; * действие на специфические рецепторы; * действие на мембраны клеток; * влияние на активность ферментов; * влияние на синтез гормонов и процессы передачи сигнала; * влияние на активность гормонов; * влияние на белки-переносчики; * влияние на продукцию иммуноглобулинов; * влияние на процессы апоптоза; * влияние на процессы хемотаксиса; * влияние на процессы адгезии; * влияние на процессы фагоцитоза и др.

Молекулярными мишенями воздействия ионных или атомных форм МЭ служат:

* гемсодержащие белки и ферменты; * системы пероксидного и свободнорадикального окисления липидов и белков; * системы антиоксидантной защиты; * ферменты транспорта электронов и синтеза АТФ; * факторы транксрипции; * белки клеточных мембран и ионные каналы мембран.

Факторы, влияющие на токсическое действие МЭ:

* способность токсиканта конкурентно взаимодействовать с эссенциальными элементами; * способность к образованию металл-белковых комплексов с различными кинетическими и термодинамическими

характеристиками; * возможность длительного воздействия на структуру-мишень; * наличие различных химических форм элемента; * состояние иммунного статуса организма.

Токсические эффекты химических элементов, в первую очередь таких как ртуть или мышьяк, обусловлены определенными свойствами.

Сродство к сульфгидрильным группам (-SH)

Ряд МЭ имеют значительную аффинность к сульфгидрильным группам белковых молекул. Большинство ферментов ингибируется металлами, относящимися к группе реагентов на SH-группы, или *тиоловых ядов*. SH-группы как сильные нуклеофилы отличаются высокой реакционной способностью, что обусловлено значительной поляризуемостью атома серы. Тиоэфирные и дисульфидные группы вступают в не столь разнообразные реакции, как SH-группа. Устойчивость S–S- связей при физиологических значениях pH соответствует их основной функции — участию в стабилизации макромолекулярной структуры белков.
Дисульфидные группы в активных центрах окислительных ферментов подвергаются обратимому превращению в SH-группы при взаимодействии с субстратами и участвуют в каталитических реакциях. *Белки часто становятся мишенями для металлов*. Формирование ковалентных связей –SH и/или *RS*-металлы может *ингибировать* активность ферментов или *нарушать* целостность клеточных мембран. Последнее подтверждается признаками дестабилизации липопротеиновых комплексов, происходящей за счет конформационной перестройки апопротеиновой части комплексов из-за блокирования SH-групп.

Формирование связей с -SH группами цистеиновых остатков пептидов и белков является одним из основных механизмов ингибирующего действия токсичных металлов в отношении антиоксидантной системы, что достигается как за счет взаимодействия с кофакторами — глутатионом, тиоредоксином и глутаредоксином, что сопровождается снижением их внутриклеточного пула, так и за счет инактивации ферментов антиоксидантной защиты, таких как глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, Mn-супероксиддисмутаза, тиоредоксинредуктаза.

Помимо этого, на примере метилртути (HgCH3) было продемонстрировано, что сродство к тиоловым группам и последующая модификация цистеиновых фрагментов белков Keap1 (Cys151, Cys319), PTEN и p50 (Cys62) обусловливает модулирующее влияние метилртути на активность сигнальных путей Nrf2, Akt/CREB и NF-κB, вовлеченных в регуляцию апоптоза (см. гл. 2). Модуляция активности данных путей также обусловливает влияние метилртути на транскрипционную регуляцию активности антиоксидантной системы и развитие воспалительной реакции.

Комплекс, образуемый метилртутью и цистеином, имитирует аминокислоту метионин, необходимую для биосинтеза адреналина и холина (*эффект мимикрии*), что приводит к ингибированию активности соответствующих ферментов. Эффекты молекулярной мимикрии также во многом обусловливают транспорт соединений ртути в организме, в том числе посредством транспортера больших нейтральных аминокислот (LAT1).

Сродство к селеноловым группам (-SeH)

Широко известна роль ртути как тиолового яда вследствие высокого сродства к -SH группе, однако сродство соединений ртути к селенолам значительно выше, что и обусловливает во многом антагонистические взаимосвязи между ртутью и селеном. Химическое взаимодействие между этими элементами обусловливает роль селенопротеинов, таких как глутатионпероксидаза или тиоредоксинредуктаза, в качестве мишеней токсического действия ртути.

В то же время данный механизм обусловливает антагонизм селена и селенсодержащих биомолекул не только с соединениями ртути, но и других металлов. В частности, соединения с донорным атомом селена представляют собой мягкие основания Пирсона (см. курс биоорганической химии — принцип ЖМКО Пирсона), тогда как ионы Hg(II), Hg(I), Cd(II), Pb(II), Al(III) являются кислотами Пирсона, причем Al(III) – типичная жесткая кислота, Hg(II), Hg(I), Cd(II) – мягкие кислоты, ионы Pb(II) занимают промежуточное положение. В этой связи в соответствии с принципом Пирсона, следует предположить, что селендонорные лиганды преимущественно связываются с ионами Cd(II) и Hg(II), в меньшей степени с Pb(II).

Конкуренция и замещение катионов эссенциальных элементов. Замена металлов в металлсодержащих биокомплексах вызывает изменение их биологической активности. Например, свинец, замещая цинк в цинкзависимом ферменте дегидратазе 5-аминолевуленовой кислоты (ALA-D), ингибирует синтез гема — важного компонента гемоглобина и гемсодержащих ферментов, таких как цитохромы. Аналогично одним из наиболее выраженных антагонистов цинка является кадмий, который также способен вытеснять цинк из активных центров белков.

Иногда комплексообразование МЭ опосредовано ведет *к активации* фермента. Уреаза катализирует гидролитическое расщепление мочевины на аммиак и углекислый газ. Каждая молекула уреазы связана с двумя атомами никеля. Не исключено, что никель в уреазе играет ту же роль, что и цинк в карбоксипептидазе. При интоксикации кадмием наблюдается его синергизм с никелем. Кадмий, образуя координационное соединение с аммиаком, сдвигает равновесие реакции вправо, что приводит к активации уреазы. Кроме того, кадмий, замещая и высвобождая ионы никеля, способствует работе других ферментов, катализирующих гидролиз глутамина с образованием аммиака, который может проявлять нейротоксическое действие.

Указанные свойства химических элементов во многом обусловливают *молекулярные механизмы развития токсического эффекта металлов* в организме.

Окислительный стресс

Окислительный стресс является нарушением редокс-гомеостаза клетки, которое характеризует дисбаланс между продукцией АФК и активных форм азота и активностью антиоксидантной системы, что приводит к окислительному повреждению макромолекул. Индукция окислительного стресса является одним из наиболее изученных механизмов токсического действия металлов. Так, при избыточной кумуляции МЭ происходит как повышенная генерация АФК, так и угнетение звеньев антиоксидантной системы. С одной стороны, ряд МЭ, относящихся к эссенциальным, являются металлами с переменной валентностью, в связи с чем способны участвовать в генерации свободного гидроксильного радикала в реакции Фентона. С другой — хорошо известна индукция прооксидантных ферментов, таких как НАДФН-оксидаза и ксантин-оксидаза, генерирующих супероксид-анион радикал. Развитие митохондриальной дисфункции вследствие токсического действия металлов также сопровождается повышением продукции супероксида дыхательной цепью митохондрий. В свою очередь, ингибирование антиоксидантной системы может являться как следствием избыточной генерации АФК и активных форм азота с последующей окислительной модификацией молекул антиоксидантных ферментов и/или истощением пула восстанавливающих кофакторов (в первую очередь GSH), так и непосредственно следствием нарушения функции фермента из-за прямого взаимодействия металла с аминокислотными остатками (как в случае реакции между Hg и -SH/-SeH) или вытеснения катионов эссенциальных металлов из активного центра фермента.

Однако исследования последних лет показали более сложные взаимосвязи между МЛГ и редокс-гомеостазом клетки, что может быть обусловлено влиянием МЭ на системные механизмы регуляции редокс-гомеостаза, к которым относится сигнальный путь Keap1/Nrf2.

Nrf2, ядерный фактор, связанный с эритроидом-2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), является одним из ключевых регуляторов редокс-гомеостаза. В физиологических условиях Nrf2 находится в связи с регуляторным белком Keap1, богатым цистеиновыми остатками. В прооксидантных условиях, в том числе вследствие металл-индуцированного окислительного стресса, происходит диссоциация комплекса Keap1/Nrf2 с последующей транслокацией Nrf2 в ядро, связыванием с антиоксидант-респонсивным элементом (ARE) и индукцией транскрипции антиоксидантных ферментов [в том числе глутатионпероксидазы, НАДФН-хинон оксидоредуктазы — NQO1, гемоксигеназы (НО-1) и др.]. Несмотря на то что данный механизм является физиологическим компенсаторным механизмом, направленным на противодействие избыточной генерации АФК, в том числе при избытке МЭ, ряд токсичных металлов, таких как Cd, Pb, As, способны ингибировать Nrf2 сигнальный путь, что в дальнейшем способствует усугублению нарушений редокс-гомеостаза.

Генотоксичность

Прооксидантное действие металлов тесно связано с генотоксическим эффектом. В частности, индукция окислительного стресса при избытке МЭ сопровождается окислительным повреждением нуклеиновых кислот с

образованием аддуктов, сшивок между молекулами ДНК и белков, а также одно- и двуцепочечными разрывами ДНК. С другой стороны, для ряда МЭ отмечено ингибирующее влияние в отношении механизмов репарации ДНК, в первую очередь 8-оксогуанин-ДНК-глиоксилазы (Ogg1), что способствует кумуляции окислительно-модифицированных азотистых оснований и сопровождается снижением геномной стабильности. Генотоксическое действие таких МЭ, как Cd, Hg, Pb, As, обусловливает их роль в процессах канцерогенеза (см. ниже).

Помимо этого, *генотоксическое действие* ряда МЭ, вызывающих дефекты и мутации как в ядерной, так и в митохондриальной ДНК, также вовлечено в патогенез митохондриальной дисфункции. Образование аномальных и модифицированных митохондриальных белков индуцирует образование антимитохондриальных антител. В физиологических условиях продукция антимитохондриальных антител способствует замене поврежденных или стареющих органелл. Например, ионы таких металлов, как Cd, Pb, Ni, могут блокировать активность Zn-зависимой пептидазы, находящейся в межмембранном пространстве митохондрий и участвующей в процессе транспорта белков в митохондрии. Накопление аномальных белков угнетает митохондриальные функции. Несмотря на эволюционно предусмотренные особенности митохондриального генома, обеспечивающие его значительные адаптационные возможности (множество транскриптонов, протяженные интронные и концевые некодирующиеся последовательности в мДНК и мРНК), суммирование врожденных и приобретенных дефектов приводит к возникновению митохондриальной недостаточности.

Воспалительная реакция

Одним из механизмов токсического действия металлов является индукция воспалительной реакции. Причем данный эффект наблюдается как системное действие при увеличении уровня металлов в организме, так и локальное, например, при ингаляции металлсодержащих частиц.

Механизмом развития воспалительной реакции служит активация TFs NF-κB, являющегося ключевым регулятором секреции провоспалительных цитокинов. При этом провоспалительная активность металлов тесно связана с прооксидантной активностью, поскольку NF-κB служит редокс-чувствительным TFs и при избыточной продукции АФК (в первую очередь за счет активации НАДФН-оксидазы) происходит активация киназы ингибитора κB (IKK), фосфорилирующей ингибитор kB (IκB), таким образом способствуя диссоциации комплекса IκB с NF-κB и обеспечивая транслокацию последнего в ядро. Связывание NF-κB с соответствующими элементами приводит к активации транскрипции провоспалительных цитокинов, таких как ФНОα, ИЛ-1β и ИЛ-6, провоспалительных ферментов (ЦОГ, ЛОГ), а также молекул адгезии. При этом активация сигнального пути NF-κB характерна как для безусловно токсичных металлов, таких как ртуть или кадмий, так и для эссенциальных микроэлементов, в первую очередь меди, в условиях избыточной кумуляции обладающей провоспалительным действием.

Результаты исследований последних лет продемонстрировали, что избыточное воздействие токсичных МЭ способствует их кумуляции в организме и транспорту в органы-мишени, среди которых особое место занимает ЦНС. Кумуляция металлов в головном мозге сопровождается реализацией их нейротоксического действия, важным механизмом которого является нейровоспалительная реакция. В ходе ее развития под влиянием как избытка эссенциальных металлов (Fe, Cu, Mn), так и токсичных элементов (Hg, Cd, As, Pb), значительную роль играет активация глиальных клеток и приобретение провоспалительного фенотипа М1 вследствие металл-индуцированной активации сигнального пути NF-κB. Многочисленные исследования показали, что данный механизм обусловливает роль избытка МЭ в развитии нейродегенеративных заболеваний, ишемического инсульта и нарушений нервно-психического развития, таких как расстройства аутистического спектра.

Нарушение регуляции апоптоза. Апоптоз — автономный процесс клеточной смерти, который требует активного участия эндогенных клеточных ферментов для демонтажа клетки (см. гл. 2). МЭ могут модулировать программу апоптоза посредством как уже известных механизмов, так и пока еще окончательно не установленных. Апоптоз реализуется разными путями, во всех из них участвуют *каспазы* — цистеиновые протеазы.

Канонический апоптотический путь смерти клетки реализуется, когда лиганд связывается с рецепторами семейства ФНО-α, имеющими «домен смерти» в цитозоле. При этом происходит активация протеазы 8, которые и являются эффекторами гибели клеток (см. гл. 2).

В ходе другого пути, ведущим является митохондриальная дисфункция, сопровождающаяся увеличением поступления цитохрома с в цитоплазму клетки, что впоследствии приводит к активации каспазы 9. Именно последний механизм является ведущим в условиях избытка или дефицита МЭ. Ионы токсичных МЭ (свинец, никель, кадмий, ртуть и др.) способны блокировать протеазы митохондрии, что ведет к развитию приобретенной *митохондриальной дисфункции*.

В патогенезе митохондриальной недостаточности существенную роль играет *генотоксическое действие* ряда МЭ, вызывающих дефекты и мутации как в ядерной, так и в митохондриальной ДНК. Образование аномальных и модифицированных митохондриальных белков индуцирует образование антимитохондриальных антител. В физиологических условиях продукция антимитохондриальных антител способствует замене поврежденных или стареющих органелл. Например, ионы таких металлов, как Cd, Pb, Ni, могут блокировать активность Zn-зависимой пептидазы, находящейся в межмембранном пространстве митохондрий и участвующей в процессе транспорта белков в митохондрии. Накопление аномальных белков угнетает митохондриальные функции. Несмотря на эволюционно предусмотренные особенности митохондриального генома, обеспечивающие его значительные адаптационные возможности (множество транскриптонов, протяженные интронные и концевые некодирующиеся последовательности в мДНК и мРНК), суммирование врожденных и приобретенных дефектов приводит к возникновению митохондриальной недостаточности.

Блокирование или индукция генов — *регуляторов апоптоза* могут вызываться различными внутренними и внешними сигналами. Белки семейства Bcl 2 и некоторые другие способны проникать в липидный бислой мембран и формировать *pH-чувствительные ионные каналы*, которые переносят катионы металлов в виде комплексов согласно кинетическим закономерностям. В генной регуляции апоптоза играют важную роль ингибитор апоптоза — белок Bcl 2, обладающий антиоксидантными свойствами, действующий подобно свободно-радикальной ловушке, и другой регулятор генной стабильности — белок p53. Например, апоптоз, индуцированный МЭ, вызывающими разрывы ДНК, зависит от транскрипции p53.

Ионы ряда металлов: Ni^2+^, Pb^2+^, Cd^2+^ и другие — могут вызывать мутации или повреждение Rb-гена, что приводит к *клонированию мутировавшей клетки*. Известно, что Cr, Pb, Hg, Cd проявляют синергизм в реализации генотоксического эффекта. Другие группы проявляют антагонизм в реализации геноповреждающего действия:

* Se — Mo, Ni, As, Hg, Cr; * As — Zn, Se; * Zn — Ni, Pb, Fe, Cu, Cd, Hg, As; * Pb — Mn, Co, Fe, Cu, Zn; * Co — Pb, Cd; * Fe — Mn, Cd, Cu, Hg, Zn, Ni, Pb; * Cu — Pb, Fe, Cd, Zn; * Cd — Mn, Co, Fe, Cu, Zn, Se.

Учитывая специфическое влияние различных МЭ на регуляцию апоптоза, их *дисбаланс* опосредованно может стать *пусковым механизмом апоптоза*.

Нарушение процессов регуляции апоптоза приводит к возникновению заболеваний. Повышенная активация апоптоза, связанная с функцией Ca^2+^-, Mg^2+^-зависимых эндонуклеаз, является звеном в патогенезе СПИДа, нейродегенеративных и ишемических заболеваний; ингибирование апоптоза может быть вызвано избытком ионов Zn^2+^ и способствовать развитию опухолей различной природы, вирусных заболеваний.

Сегодня уже можно констатировать ряд экспериментально доказанных фактов участия *макро- и микроэлементов* в процессах апоптоза:

* цинк ингибирует активный центр каспаз 3, 6 и 9, запускающих начальные этапы апоптотического процесса; белки Bcl содержат ряд гомологичных BH-областей (BH1, BH2, BH3, BH4), из которых BH3 ответственна за проапоптотическую деятельность. Цинк способен стабилизировать эти регионы связывания, блокируя и предотвращая апоптоз; * цитохром c при высвобождении через митохондриальные поры запускает активацию каспаз (железо — компонент гема в составе цитохрома c), отсутствие гема в составе цитохрома или связывание иных металлов с гемовой группировкой препятствует процессам активации; * кальций, магний, марганец являются кофакторами эндонуклеаз, участвующих в деградации ДНК, но цинк и кадмий способны конкурировать за центры связывания, что тормозит этот процесс; * дефицит меди снижает активность цитохром-c-оксидазы, что может объяснить влияние дефицита меди на регуляцию апоптоза; * селензависимые ферменты митохондрий — тиоредоксинредуктаза или фосфолипидпероксидаза — способствуют защите тиольных

групп от свободно-радикального повреждения и препятствуют активации, открытию пор и высвобождению цитохрома c (многие металлы, как известно, — тиоловые яды); * комплексы ванадия активируют процессы диссоциации Bcl-Bad или Bcl-Bax, что ведет к апоптозу.

Эпигенетические механизмы

Эпигенетика изучает наследуемые изменения активности генов во время роста и деления клеток. Наряду с влиянием МЭ, в первую очередь токсичных металлов, на генетический аппарат клетки вследствие их прямого генотоксического действия или нарушения процессов репарации ДНК, результаты исследований последних лет показали, что дополнительным механизмом влияния токсичных МЭ на процессы экспрессии генов могут являться эпигенетические нарушения. Известно, что токсичные металлы, такие как кадмий, свинец, мышьяк, и предположительно ртуть, способны индуцировать эпигенетические нарушения посредством влияния на следующие механизмы:

* изменение метилирования ДНК (гипометилирование/гиперметилирование), что может обусловливать как стимуляцию, так и ингибирование экспрессии отдельных генов; * модификация гистоновых белков, которая может быть обусловлена фосфорилированием, метилированием, ацетилированием, убиквитинированием или другими модификациями; * экспрессия патологической микроРНК, которая тормозит процессы трансляции белка-мишени.

Интересно, что антагонизм между Cd и Zn может по крайней мере отчасти обусловливать эпигенетические эффекты кадмия вследствие кадмий-индуцированного замещения Zn^2+^ в активном центре TET белков/гистоновых деметилаз, что приводит к повышению метилирования ДНК и гистоновых белков.

Экспериментальные *in vivo* и *in vitro* исследования отчетливо продемонстрировали, что металл-индуцированные эпигенетические нарушения вовлечены в патогенез широкого спектра патологических состояний, в первую очередь нейродегенеративных и онкологических заболеваний.

Нарушение синтеза цитохрома P450, ответственного за биотрансформацию токсикантов и эндогенных биологически активных веществ: гормонов, витаминов, холестерина и др. Это приводит к накоплению органических токсикантов в тканях или нарушению синтеза или активности эндогенных метаболитов природных веществ.

Селективные механизмы токсического действия элементов в определенной химической форме

Арсенат-ион AsO~4~^3–^ подобен фосфат-иону по размеру и структуре. Арсенат может замещать фосфат во всех фосфоролитических реакциях, например в реакции расщепления гликогена, катализируемой гликогенфосфорилазой. Однако эфиры мышьяковой кислоты менее устойчивы. Промежуточный продукт глюкозо-1-арсенат быстро гидролизуется с образованием глюкозы (арсенолиз) и вместо фосфата появляется арсенат, т. е. процесс не прекращается, но АТФ не образуется (арсенат разобщает процессы окисления и фосфорилирования).

Селективные механизмы токсического действия элементов в определенных органах и тканях

Специфические механизмы токсического действия МЭ могут наблюдаться в высокоспециализированных клетках, в первую очередь нейронах. В частности, отмечается влияние широкого спектра металлов на процессы метаболизма нейромедиаторов, что обладает широким спектром нейропатологических проявлений. Одним из наиболее характерных механизмов нарушения метаболизма нейромедиаторов является токсичность возбуждающих нейромедиаторов, в первую очередь глутамата. Данный механизм наиболее детально охарактеризован для марганца (Mn^2+^). В частности, избыточное воздействие марганца сопровождается торможением транспортеров глутамата (GLAST и GLT1), что приводит к увеличению его концентрации в синаптической щели. Такой механизм был предложен для объяснения нейротоксического действия ртути, свинца и, возможно, мышьяка.

Токсичные МЭ могут *нарушать структуру и функции ряда органелл*. Например, могут ингибировать ферменты, связанные с эндоплазматическим ретикулумом, ферменты дыхательной цепи в митохондриях, аккумулироваться в лизосомах, а в ядрах могут образовывать включения. У наркоманов, использующих эфедрон, обнаружено (методом компьютерной томографии) отложение MnO~2~ в некоторых структурах головного мозга. Это приводит к необратимым последствиям.

Поскольку мужские и женские репродуктивные органы находятся под сложным нейроэндокринным и гормональным контролем, то любой токсикант, влияющий на эти процессы, способен повлиять также и *на репродуктивную функцию*. Однако металлы могут и селективно воздействовать на репродуктивные органы. Известно, что кадмий поражает яички в результате острого отравления, а аккумулирование свинца в яичках связывают с дегенерацией последних, ингибированием сперматогенеза и атрофии клеток Лейдига.

Иммунный статус организма особенно важен при воздействии металлов, вызывающих реакции гиперчувствительности. Иммунные реакции провоцирует избыточное введение ртути, золота, платины, бериллия, хрома и никеля. В иммунный ответ может включаться любой тип реакции гиперчувствительности.

Канцерогенность. Бериллий, кадмий, хром (в степени окисления +6), мышьяк и некоторые соединения никеля оказывают канцерогенное действие на людей и экспериментальных животных при ингаляционном пути введения. Свинец является канцерогеном для животных, но не для людей. Другие металлы — медь, цинк и ртуть — не обнаруживают канцерогенный эффект.

Для проявления канцерогенного эффекта весьма важен способ введения металла. Кадмий и хром (в степени окисления +6) канцерогенны только при ингаляционном поступлении, а мышьякМышьяк и его неорганические соединения официально отнесены к канцерогенам при всех путях поступления в организм (МАИР, СанПиН 1.2.235–08, ГН 2.2.5.1313–03 и др.). и бериллий оказывают канцерогенное воздействие при ингаляционном, пероральном и, вероятно, дермальном путях поступления.

Каждый металл, обладающий канцерогенными свойствами, по-видимому, имеет *уникальный механизм* действия при определенных путях поступления. Хром (в степени окисления +6) восстанавливается в клетках до Cr^3+^ и образует прочные аддукты с ДНК и белками. Биологически активные канцерогены — скорее всего, это промежуточные вещества, образующиеся при восстановлении хрома. Данные по токсикогенетике подтверждают гипотезу о том, что хром (в степени окисления +6) негенотоксичен *per se*, но что его генотоксичность опосредована внутриклеточным восстановлением хрома. Парадоксально, но Cr^3+^ не индуцирует повреждение ДНК, даже несмотря на то, что связывается с ДНК *in vitro* и *in vivo*. Ионы никеля накапливаются в клетках, образуют АФК, которые, по мнению ряда исследователей, становятся причиной генотоксического повреждения, связанного с канцерогенностью никеля.

Мышьяк играет роль негенотоксичного непрямого канцерогена, ингибирующего стадию починки ДНК (см. гл. 2). Ионы Co^2+^ индуцируют ПОЛ, подавляют репарацию ДНК и обладают комутагенными с ионами Ni^2+^, Pb^2+^, Cd^2+^ свойствами, запускают синтез противовоспалительного цитокина TNF-α, вызывающего апоптоз и некроз клеток-мишеней.

Несмотря на то что большинство исследователей считают ртуть неканцерогенным металлом, увеличивающееся в последние годы количество наблюдений свидетельствует в пользу возможной роли ртути в процессах канцерогенеза. В частности, соединения ртути способны индуцировать пролиферативную реакцию в клетках организма посредством влияния на сигнальные пути эстрогенового рецептора, ERK1/2, JNK и НАДФН-оксидазы, а также Nrf2. Наряду с ингибированием процессов апоптоза при низкодозовом воздействии и кумуляции повреждений ДНК эти механизмы могут обусловливать роль хронического воздействия ртути в канцерогенезе.

В организме человека при отравлении металлами усиливается продукция метаболитов белковой природы, которые *связывают, инактивируют и экскретируют токсиканты*. Липопротеины внутри почечных лизосом функционируют именно таким образом, т. е. обеспечивают защиту почек, которые особенно подвержены повреждению металлами.

Неспецифическое связывание с белками, например с сывороточным альбумином и гемоглобином, играет важную роль в процессах транспорта металлов в кровеносном русле и распределения металлов между эритроцитами и плазмой.

Белки *со специфическими металлсвязывающими свойствами* участвуют в транспорте металлов в клетку:

* металлотионеин; * трансферрин; * трансманганин; * α2-макроглобулин (ранее известный как транскупреин); * никелеплазмин и др.

После присоединения к белку металл (например, кадмий-металлотионеин) поступает в клетку путем эндоцитоза.

Связывание МЭ с лигандами определяет не только особенности транспорта, но и токсичности металлов в условиях их избытка. Так, к примеру, смещение в сторону фракции меди, представленной свободным металлом или связанным с низкомолекулярными лигандами (аминокислоты, цитраты), сопровождается увеличением риска реализации прооксидантного действия металла. Подобный механизм вовлечен в патогенез ряда заболеваний, в первую очередь болезни Альцгеймера.

Токсичность металлов, прежде всего кадмия, свинца и ртути, зависит от их внутриклеточной биодоступности и частично регулируется *специфическим связыванием* с лигандами — некоторыми цитозольными белками, которые содержат многочисленные SH-центры. Внутриклеточные соединения способны удалять токсичные металлы из чувствительных органелл до тех пор, пока их связывающую способность не превысит доза токсиканта. При этом в печени происходит индуцируемый рядом факторов *синтез металлотионеинов*. Физиологическим индуктором синтеза металлотионеина является цинк, что может, по крайней мере отчасти, обусловливать протективное действие цинка в отношении интоксикации кадмием. В то же время в экспериментах *in vivo* экспозиция кадмием приводит к синтезу металлотионеинов в печени и образованию кадмий-металлотионеинового комплекса, который можно обнаружить в кровотоке доступными методами.

Металлотионеины — это класс серосодержащих металлсвязывающих белков, продукция которых значительно усиливается в ответ на поступление кадмия, ртути, цинка, меди и некоторых других металлов. Металлотионеин — низкомолекулярный металлсвязывающий белок (молекулярная масса приблизительно 7 000 Д), состоящий из 61 аминокислотного остатка. Этот белок способен связывать 7–10 атомов металлов (Zn, Cu, Cd, Hg, Au, Ag) и предохранять организм от интоксикации ионами металлов. В виде комплекса с металлотионеином происходит внутриклеточный транспорт антагонистов — меди и цинка, депонируется цинк. Ионы цинка и меди стимулируют выработку металлотионеина, причем активность цинка выражена в большей степени, однако более прочным является образующееся комплексное соединение с ионами меди. Повышение в организме концентрации ионов цинка вызывает выработку дополнительного количества металлотионеина, который связывает ионы меди, уменьшая тем самым их концентрацию в плазме. Разная степень сродства МЭ к тем или иным биолигандам может быть *причиной их антагонизма*.

Не менее важна детоксицирующая функция других белков и гликопротеинов. Существующий в восстановленной и окисленной формах *трипептид глутатион* ответственен за перенос аминокислот через клеточные мембраны (см. гл. 3). Разнообразные функции глутатиона осуществляются при участии SH-группы. Глутатион защищает SH-группы внутриклеточных ферментов от окисления, блокирования металлами и другими токсикантами, участвует в устранении АФК и продуктов ПОЛ. В частности, восстановление H~2~O~2~ и пероксидов липидов (в основном) катализируется *селенсодержащей глутатионпероксидазой*.

Трансферрин — гликопротеин, связывающий бóльшую часть плазменного железа. Трансмембранный транспорт железа осуществляется трансферрином по принципу эндоцитоза. Этот же белок может транспортировать *алюминий* и *марганец*.

Ферритин — белок, осуществляющий хранение железа в ретикулоэндотелиальных клетках печени, селезенки и костной ткани — может функционировать как детоксикант, так как связывает многие токсичные металлы, включая *кадмий, цинк, бериллий, алюминий.*

Церулоплазмин — медьсодержащая гликопротеиноксидаза, окисляющая железо(II) в железо(III), которое затем связывается с трансферрином, — усиливает поглощение и накопление железа.

Симптоматика отравления металлами (общие сведения)

Острое отравление (обычно) вызывает содержание в организме металла в относительно высокой концентрации. Латентный период после первичного воздействия до проявления клинических симптомов, как правило, небольшой,

порядка от нескольких часов до нескольких дней. В силу (в основном) *разрушающего действия на клеточные мембраны* металлы могут дать различные локализованные эффекты в месте *первичного контакта*.

Обычные *симптомы острого отравления* металлом при *пероральном пути* воздействия: тошнота, рвота, повреждение слизистой оболочки кишечника и всего ЖКТ. *Острое ингаляционное отравление* металлом часто приводит к раздражению верхних дыхательных путей, кашлю или одышке, а также повреждению легких и эпителия респираторного тракта.

Острое трансдермальное отравление может привести к локальной сыпи и раздражению кожи или изменению ее цвета.

Некоторые металлы оказывают *направленное токсическое воздействие*. Так, высокий уровень свинца в организме приводит к серьезным неврологическим нарушениям, включая конвульсии или кому, а также к нарушению гематопоэтической системы, в особенности продукции гема. Интоксикация свинцом может привести к трудностям в обучаемости, нарушениям поведения, перевозбуждению или летаргии и атаксии (см. далее п. 9.3 — металлы как экотоксиканты).

Токсические эффекты *острого отравления ртутью* варьируют в зависимости от формы металла, присутствующей в организме. Воздействие больших количеств паров *элементной ртути* или метилртути, скорее всего, окажет большее воздействие на ЦНС, чем воздействие неорганических солей ртути, в силу различий прохождения через гематоэнцефалический барьер. *Метилртуть* из-за липофильной природы легко преодолевает его в отличие от неорганической ртути. Пары *элементной ртути* способны проникать через мембраны клеток. Хроническое воздействие *солей ртути* вызывает перевозбуждение и даже психоз. Он был определен как «синдром спятившего шляпника», так как в XIX в. наблюдался у изготовителей шляп, которые подвергались в процессе производства воздействию нитрата ртути. Существует даже английская поговорка: «Безумен как шляпник».

Ряд металлов *депонируется* в тканях на длительный период. Например, свинец может замещать кальций в растущей кости ребенка, что провоцирует долгосрочное отложение свинца и последующее медленное его высвобождение. Долгое время у пострадавшего будут наблюдаться серьезные токсические симптомы, несмотря на прекращение воздействия токсиканта.

Повреждение и снижение функции печени и почек — типичный результат *хронического воздействия* многих металлов, по-видимому, в силу роли этих органов в концентрировании, детоксикации и экскреции токсикантов. Хронические отравления свинцом, ртутью и кадмием всегда связаны с повреждением почек, а хроническое воздействие меди вызывает повреждение печени.

Наиболее восприимчивы к действию металлов дети и пожилые люди. Дети потребляют больше калорий на единицу массы, поэтому важный путь поступления металлов — именно с пищей. Кроме того, ЖКТ детей легко проницаем для большинства металлов, особенно для свинца. Из-за процессов активного клеточного деления организм ребенка более чувствителен к генотоксическим эффектам металлов.

Вредные привычки усиливают проявление токсичности ряда металлов. Так, сигаретный дым содержит кадмий и стронций. Оба элемента вследствие своих физико-химических свойств могут занять место кальция в кристаллической решетке основного минерала кости — апатита. Поскольку размер иона кадмия меньше, а иона стронция больше, чем иона кальция, кость разрыхляется и наблюдаются признаки остеопороза. Прием *алкоголя* значительно уменьшает биодоступность или усиливает экскрецию эссенциальных металлов.

Существуют объективные высокочувствительные методы исследования нативных биологических жидкостей для оценки состояния гомеостаза на молекулярном уровне, следовательно, и тяжести повреждений, например метод *лазерной COSY,* основанный на изменении спектральных характеристик монохроматического когерентного излучения гелий-неонового лазера в результате светорассеяния при прохождении через дисперсную систему.

На рис. 7-17 показаны основные биологические свойства микроэлементов.



Рис. 7-17. Основные биологические свойства микроэлементов (по R. Brann et al.)

7.5.2. Химико-токсикологические характеристики элементов

Сотри случайные черты
И ты увидишь: мир прекрасен.
Познай, где свет,
Поймешь, где тьма.

Александр Александрович Блок (1880–1921),
великий русский поэт-символист Серебряного века,
классик русской литературы XX века

Благо везде и всюду зависит от соблюдения двух условий: правильного установления конечной цели всякого рода деятельности и отыскания соответствующих средств, ведущих к конечной цели.

Аристотель (384 г. до н.э.–322 г. до н.э.),
древнегреческий философ,
ученик Платона, воспитатель А. Македонского

В начале XX в. профессор Московского университета В. И. Вернадский на съезде русских врачей и естествоиспытателей сделал основополагающий доклад о связи химического строения земной коры, свойств рассеянных элементов (микроэлементов) и состояния здоровья человека. Развитие знаний об элементном статусе человека и значении химических элементов для жизни и здоровья тесно связано с именами наших выдающихся соотечественников: В.И. Вернадского, А. П. Виноградова, А. И. Венчикова, В. В. Ко-вальского, Г. А. Бабенко, А. П. Авцына и рядом других видных ученых — биогеохимиков, биологов и медиков.

На рис. 7-18 представлены возможные пути поступления, распределения и выведения химических элементов.

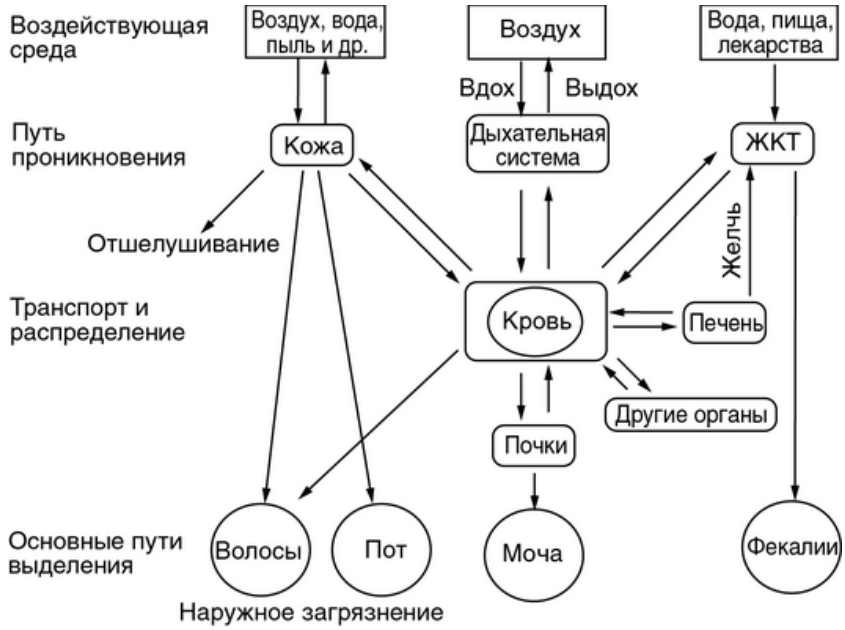


Рис. 7-18. Поступление, распределение и выведение химических элементов

Индивидуальные особенности токсикокинетических процессов отдельных элементов всегда должны обсуждаться с учетом их химико-токсикологических характеристик, которые приведены в многочисленной специальной литературе. Рекомендуем обратить внимание на обширный справочный материал, составленный авторами на основе собственных и литературных данных, который представлен на электронном приложении к первому изданию учебника, где приведены *химико-токсикологические характеристики элементов*: лития, меди, серебра, золота, бериллия, стронция, бария, цинка, кадмия, ртути, бора, алюминия, галлия, таллия, германия, олова, свинца, ванадия, мышьяка, сурьмы, висмута, хрома, селена, молибдена, марганец, иода, железа, кобальта, никеля.

7.5.3. Выбор биообъектов для элементного анализа

Старайся прежде быть мудрым,
а ученым — когда будет свободное время.

Пифагор Самосский (570–495 гг. до н.э.),
древнегреческий философ, математик,
астроном, музыкант, создатель
философской школы пифагорейцев

При выборе объекта исследования учитывают *токсикокинетические характеристики* (в каком из биосубстратов концентрация предполагаемого токсиканта может быть выше) и *информативность объекта* (в каком из них содержание токсиканта наиболее соответствует наблюдаемым эффектам воздействия). Так, при изучении действия свинца установлено, что в крови больше всего он концентрируется *в эритроцитах* и лишь 1–2% находится в плазме.

В табл. 7-18 приведены биосубстраты и биомаркеры эффекта (см. гл. 1), наиболее часто используемые при оценке элементного статуса человека.

Методы определения элементов в биообъектах подробно описаны в п. 5.4.3.

Таблица 7-18. Биосубстраты и биомаркеры эффекта, используемые при оценке элементного статуса человека (по H. P. Bertram, с дополнением А. В. Скального)

Элемент	Биообъекты		Биомаркеры
	общепринятые	возможные	
Al	Плазма крови	Моча, волосы	P; Ca-щелочная фосфатаза
Sb	Моча, волосы	Цельная кровь	Специфические изменения в клинической картине крови

As	Моча, волосы, ногти	Кровь	Аминолевулиновая кислота, фетальный эритропротеин δ, данные аудиограммы
Pb	Цельная кровь, моча	Волосы, зубы	Аминолевулиновая кислота в моче, нервно-мышечная проводимость, цинк-протопорфирин, копропорфирин
Cd	Моча и цельная кровь	Волосы	β~2~-микроглобулин в моче
Cr	Эритроциты	Волосы	Гиалуронидаза плазмы крови, насыщенность трансферрина хромом, тест на толерантность к глюкозе
Fe	Плазма крови	Волосы	Ферритин плазмы, свободный эритропорфирин, насыщенность железом трансферрина
F	Моча	Волосы	Данные рентгенограмм костей
Au	Волосы, ногти	Моча, плазма крови	Специфические изменения клинической картины крови
I	Моча, плазма крови	Волосы	
Cu	Плазма крови, волосы	Моча, ногти	Церулоплазмин, лизилоксидаза, дофамин-β-гидроксилаза
Li	Плазма крови	Моча, волосы	
Mn		Волосы, моча	Результаты электроэнцефалографии, электромиографии, агглютинация эритроцитов, 17-кетостероиды в моче
Mo	Моча, плазма крови	Волосы, ногти	Церулоплазмин, соединения меди в моче, мочевая кислота в плазме и моче, активность ксантиноксидазы в эритроцитах
Pt	Моча, плазма крови	Волосы	
Hg	Моча	Кровь, волосы, слюна	Лизосомальные ферменты в плазме крови, белок в моче
Se	Моча, волосы, плазма крови	Ногти	Глутатионпероксидаза в эритроцитах
Ag	Моча	Волосы, плазма крови	
Tl	Моча, волосы	Кровь, кал	Микроскопия корней волос
Bi	Суточная моча	Волосы	
Zn	Моча, плазма крови, волосы	Слюна, ногти	Ретинолсвязывающий белок, активность карбоангидразы, изменение вкуса и обоняния

7.6. Кислоты, основания, анионы солей

Все бедствия людей происходят не столько от того, что они не сделали то, что нужно сделать, сколько от того, что они делают то, чего не нужно делать.

Лев Николаевич Толстой (1828–1910), великий русский писатель и мыслитель, один из самых известных писателей-романистов мира

К группе веществ, изолируемых экстракцией водой в сочетании с диализом, относятся минеральные кислоты — серная, соляная, азотная, щелочи, водный раствор аммиака и ряд солей, из которых токсикологическое значение имеют главным образом нитрит натрия (реже нитрит калия), нитраты натрия и аммония (реже нитрат калия), хлорат калия. Отравления этими веществами чаще всего носят производственный характер. Однако в 2022 г. с их помощью были совершены военные преступления.

Летом 2022 г. при проведении Россией СВО на Украине нашим военным токсикологам в тяжелейших условиях пришлось проводить срочные химико-токсикологические определения азотной и соляной кислот, аммиака, селитры

при массированных взрывах цистерн и других емкостей с химическими реагентами, которые устраивали украинские нацбатальоны и наемники против мирных жителей городов и поселков Донбасса. Своевременные и эффективные детоксикационные мероприятия российских специалистов спасли жизнь и здоровье многим людям.

Исследование биологических материалов на наличие этих веществ проводят, если предварительные испытания дают для этого основания или материалы дела указывают на возможность отравления указанными веществами. При переходе щелочей в карбонаты, а свободных минеральных кислот в соли их обнаружение невозможно, так как они являются составными частями животных организмов.

Анионы неорганических и некоторых карбоновых кислот в биологических жидкостях и тканях в настоящее время определяют методами ГХ-ЭЗД, ГХ-ПИД, ГХ-ТИД, ВЭЖХ, ионной хроматографии, КЭ, ИСП-МС, флуорометрии, электрохимическими, биохимическими и др. Например, смесь анионов, содержащихся в образце мочи, можно разделить методом КЭ на кварцевом капилляре (56 / 64,5 см × 50 мкм) в буферном растворе при напряжении 30 кВ и температуре 25 °С, использовать УФ-детектирование (при 350 / 60 и 245 / 10 нм), идентификацию анионов осуществить по стандартным веществам.

Наиболее распространенным способом анализа в биологических жидкостях смеси анионов, включающей бромид-, иодид-, цианид-, роданид-, нитрит- и сульфид-ионы, является перевод их в летучие пентафторбензильные производные, которые можно детектировать с помощью ГХ-ПИД и ГХ-ЭЗД. В ряде случаев применимы также химические и биохимические методы.

Объектами исследования на наличие этой группы веществ являются содержимое желудка, рвотные массы, остатки пищи, печень (при определении солей), части одежды и другие вещественные доказательства.

Изолирование кислот, щелочей, солей

Исследуемый объект смешивают с небольшим количеством дистиллированной воды до образования густой кашицы, способной фильтроваться, и через 1–2 ч смесь фильтруют. Для отделения белковых веществ смесь (даже до фильтрования) или фильтрат подвергают диализу. Диализ проводят 2–3 раза по 4–6 ч. Слитые вместе диализаты выпаривают на водяной бане до объема 5–10 мл и исследуют на наличие кислот, щелочей и солей. Для этих целей перспективен *электродиализ.*

Свободные кислоты

Изменение окраски индикаторов при контакте с объектом приводит к необходимости проведения исследований на отдельные кислоты.

Для обнаружения **свободных кислот** используют перегонку, часто при их восстановлении в более летучие соединения. Так, серную кислоту переводят в сернистую, летучую в виде ангидрида SO~2~, азотную кислоту — в оксиды азота.

Серная кислота

Качественное обнаружение

* Добавление к кислой жидкости раствора соли бария приводит к образованию обильного осадка сульфата бария, что указывает на наличие сульфат-иона, но не доказывает присутствия свободной серной кислоты. * К жидкости, полученной после упаривания диализата, добавляют медные опилки, отгоняют сернистую кислоту в приемник с раствором иода в иодиде калия. После добавления к отгону разбавленной соляной кислоты и удаления иода нагреванием вносят хлорид бария. Выпадение осадка указывает на наличие серной кислоты.

Количественное определение

Аликвоту водного извлечения титруют 0,1 М раствором гидроксида натрия в присутствии метилового оранжевого. Затем в другой части извлечения определяют количество сульфатов весовым способом. Найденные количества серной кислоты сопоставляют. Результаты определения имеют только относительное значение.

Азотная кислота

Качественное обнаружение

* Свободная азотная кислота при достаточной концентрации реагирует с белками, окрашивая их в желтый цвет (ксантопротеиновая реакция). Часть исследуемой жидкости выпаривают с шерстяными нитками, при этом шерсть окрашивается в желтый цвет. Кроме азотной кислоты, шерсть окрашивает в желтый цвет и пикриновая кислота. Отличием последней служит окрашивание самой жидкости в желтый цвет, а также окрашивание шерсти при кипячении с разведенными растворами. * Каплю исследуемой жидкости смешивают с 2–3 каплями раствора дифениламина в концентрированной серной кислоте — появляется синее окрашивание. Такое же окрашивание дают соли азотной и азотистой кислот, а также другие окислители. * К исследуемой жидкости добавляют медные опилки и выпаривают ее почти досуха. При достаточной концентрации азотной кислоты происходит восстановление ее медью в оксид азота(II), который при взаимодействии с кислородом воздуха образует оксид азота(IV) (оранжевые пары). Последний, диспропорционируя в воде, дает азотную и азотистую кислоты, которые и обнаруживаются химическими реакциями.

Соляная кислота

Качественное обнаружение

* Проводят реакцию диализата с нитратом серебра. Образование обильного осадка хлорида серебра указывает на необходимость дальнейшего исследования на свободную соляную кислоту (после предварительного определения серной кислоты!). Часть водного извлечения перегоняют. Вначале отгоняется вода, затем при повышении содержания хлористого водорода до 10% он начинает перегоняться, поэтому жидкость должна быть выпарена по возможности вся. * Дистиллят исследуют на наличие хлороводорода: реакцией с раствором нитрата серебра (обнаружение С1–); по выделению хлора при нагревании с хлоратом калия:

6НС1 + КСlO~3~ = 3С1~2~ + 3Н~2~О + КС1.

Количественное определение

Количественное определение хлороводорода важно, чтобы судить о том, имеется ли в данном случае (например, в рвотных массах) введенная кислота, а не соляная кислота желудочного сока (0,1—0,2%), которая обычно в содержимом желудка трупа уже нейтрализована.

Определенную часть водного извлечения подвергают перегонке, выпаривая содержимое колбы, как описано выше, досуха. В дистилляте определяют количество хлористого водорода титрованием по Фольгарду или весовым путем, взвешивая хлорид серебра. В случае присутствия в дистилляте сероводорода образовавшийся осадок отфильтровывают, растворяют на фильтре в 10% растворе аммиака, затем полученную жидкость подкисляют азотной кислотой, а выделившийся при этом хлорид серебра отфильтровывают и определяют количественно.

Токсичность кислот

Минеральные кислоты широко применяются в различных областях промышленности и в быту, поэтому возможны как случайные, так и криминальные отравления кислотами.

Токсикологический интерес представляют *азотная кислота* и ее соли — нитраты натрия, калия и аммония. В организме нитраты восстанавливаются в нитриты. Отравление нитратами и нитритами нередко происходит по ошибке, например вместо NaCl используют NaNO~2~.

Смертельная доза при приеме внутрь:

* серной кислоты 5 г; * азотной кислоты 8 г.

Основания

* Щелочи — NaOH, КОН и Са (ОН)~2~. * Слабое основание — водный раствор аммиака.

Наиболее часто отравления вызывает нашатырный спирт, в редких случаях — каустическая сода. Щелочи попадают в организм в основном перорально при авариях на производстве, в трубопроводах; возможно ингаляционное воздействие аммиака.

Для предварительного обнаружения (при щелочной реакции на лакмус) к вытяжке прибавляют несколько капель спиртового раствора фенолфталеина.

Аммиак

Нашатырный спирт (NH~4~OH) — 10% водный раствор аммиака (NH~3~); технический раствор аммиака содержит 28–29% NH~3~, смешивается с водой, обладает резким запахом, pH 1% водного раствора 11,7.

Качественное обнаружение

Способом обнаружения аммиака в биологическом материале является посинение красной лакмусовой бумажки от паров вытяжки. Извлечение помещают в колбу с пробкой, к нижней поверхности которой прикреплены 3 бумажки: 1-я — красная лакмусовая; 2-я — смоченная раствором сульфата меди; 3-я — смоченная раствором ацетата свинца.

Посинение бумажек 1 и 2 указывает на наличие аммиака. Для приготовления бумажки 2 берут разведенный раствор, имеющий лишь голубую окраску, которая от аммиака делается интенсивно синей.

Почернение «свинцовой» бумажки указывает на наличие сероводорода и, следовательно, на процесс гниения, что делает невозможным обнаружение введенного в организм аммиака. Образование аммиака может происходить также при наличии щелочей (NaOH, KOH), выделяющих аммиак из его солей и белковых веществ.

Токсичность

Острые отравления аммиаком на производстве очень опасны.

ПДК аммиака в воздухе 0,02 мг/л.

Отравления нашатырным спиртом составляют около 15–20% всех отравлений прижигающими жидкостями (летальность около 5%). Смертельная доза 10% водного аммиака 50–100 мл.

При отравлении небольшим количеством нашатырного спирта развиваются конъюнктивит, раздражение слизистой оболочки бронхов. В *больших концентрациях аммиак и нашатырный спирт* могут вызвать рефлекторную остановку дыхания, отек гортани, мучительный кашель с отхаркиванием отошедшей слизистой оболочки или кровянистой мокроты, одышку и цианоз.

Гидроксиды натрия, калия и кальция

Каустическая сода (гидроксид натрия, NaOH) — твердое белое вещество, растворимость в воде 42% при 0 °C, pH 1% водного раствора 13,0. Отравления гидроксидом калия, а также негашеной и гашеной известью встречаются редко.

О наличии щелочи свидетельствуют результаты титрования определенной части водной вытяжки объекта по осаждению карбонатов солей щелочных металлов хлоридом бария. Для определения катиона (Na^+^, K^+^ или Ca^2+^) используют методы элементного анализа или проводят микрокристаллоскопические реакции с гексагидроксостибатом калия, виннокаменной кислотой и оксалатом аммония (в настоящее время — очень редко).

Количественное определение катионов в биологических объектах стало возможным при использовании многоэлементных методов анализа (например, атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой и ИСП-МС), а также с помощью ионселективных электродов и пламенной фотометрии.

Токсичность

Последствия отравления гидроксидом натрия (каустическая сода) — тяжелейшие: 50% пострадавших умирают, у оставшихся в живых возникают стриктуры пищевода. Рубцовая облитерация пищевода развивается в течение 1–2

лет после ожога.

Соли щелочных металлов

Из солей наибольшее токсикологическое значение имеют соли азотистой кислоты (нитриты) и хлораты. Некоторое токсикологическое значение имеют соли щавелевой и борной (бура, $Na_2B_4O_7$) кислот. Водное извлечение подвергают исследованию на наличие солей обычно при соответствующих указаниях в материалах дела.

Нитриты

Для экспрессного определения в моче нитритов их превращают в нитромезитилен, который определяют на капиллярной колонке (15 м´0,55 мм) при 100–125 °С с использованием ТИД. Сн составляет 0,5 мкмоль. Широко применяют метод ГХ-ЭЗД для определения нитритов и нитратов (после их превращения в нитробензол) в моче, крови, слюне и других биосредах. Сн на уровне пикограммов.

Качественное обнаружение

1. Исследование водного извлечения:

а) проводят реакцию диазотирования и получения азокрасителя. К части извлечения прибавляют растворы сульфаниловой кислоты или п-нитроанилина, соляной кислоты и взбалтывают. Спустя 10 мин жидкость подщелачивают и прибавляют свежеприготовленный щелочной раствор b-нафтола — появляется оранжево-красное окрашивание или осадок;

б) к части жидкости прибавляют реактив Грисса — появляется темно-красное, красное или розовое окрашивание с образованием осадка. Степень окраски позволяет приблизительно судить о количестве нитрита и в зависимости от этого подготовить к количественному определению стандартные растворы соответствующей концентрации.

2. Перегонка водного извлечения. В колбу, соединенную с нисходящим холодильником, конец которого опущен в разбавленный раствор гидроксида натрия, помещают вытяжку, подкисляют разведенной уксусной кислотой и пропусканием из аппарата Киппа диоксида углерода собирают азотистую кислоту в виде натриевой соли. Дистиллят исследуют приведенными выше реакциями. Часть дистиллята подкисляют и прибавляют раствор иодида калия, подкисленного разведенной серной кислотой и смешанного с крахмальным клейстером, — при наличии азотистой кислоты тотчас наблюдается синее окрашивание.

Такой путь исследования единственно возможен при анализе внутренних органов трупа, так как более чувствительный способ привел бы к обнаружению следов нитритов, распространенных почти повсюду: в слюне, частях растений, земле, а следовательно, и в пыли. Следы азотистой кислоты (оксидов азота) всегда находятся и в воздухе лабораторий, поэтому необходимо соблюдать особую осторожность и наряду с основным исследованием ставить контрольный опыт.

Исследование вещественных доказательств — солей азотистой кислоты

1. К соли прибавляют уксусную кислоту — выделяются оксиды азота в виде оранжевых паров, раздражающих слизистые оболочки.

2. Проводят реакции 1а или 1б (образование азокрасителя) и выделения йода.

3. Проводят реакции на ионы Na^+ и K^+ или определяют их физико-химическими методами.

Количественное определение

Небольшое количество азотистой кислоты удобно определять колориметрическим методом. Для стандартных растворов используют нитрит серебра, приготовленного специальным способом. Прибавляют определенное количество реактива Грисса. Окраску испытуемой жидкости сравнивают с окраской рабочих растворов.

Бораты

Объекты исследования. Объектами исследования при отравлении борной кислотой или бурой являются кровь, моча, желудок с содержимым. Кровь отбирают в количестве 10 мл в пробирку с раствором ЭДТА, мочу — 20 мл в пластмассовый универсальный контейнер.

При отравлении исследуют вещественные доказательства, которые полезны для идентификации токсиканта.

Качественное обнаружение

* При нанесении раствора образца (после предварительного окисления аналита) на куркумовую бумажку происходит ее окрашивание в коричнево-красный цвет, который усиливается при высушивании. * При нанесении раствора образца на смоченную в разбавленном растворе аммиака бумагу наблюдается зеленовато-черное окрашивание (чувствительность 20 мг/л бората). * При сжигании части образца, смешанного с серной кислотой и этанолом, зеленый цвет вокруг пламени указывает присутствие бората.

Количественное определение

Ранее бораты определяли в биологических жидкостях и тканях колориметрическим методом, используя карбаминовую кислоту. В настоящее время для определения бора используется метод ИСП-МС.

Бораты найдены в следовых количествах в здоровых тканях. Концентрация бора в крови в пересчете на бораты для здоровых людей в среднем составляет 0,6 мг/л и варьирует в интервале 0,2–2,0 мг/л. Например, ежедневное полоскание горла раствором борной кислоты увеличило концентрацию борат-иона в крови у 4 взрослых людей от средней величины 0,4 мг/л до 0,8–1,1 мг/л спустя 1 нед.

Аналогичные концентрации наблюдаются после употребления вина или изюма, продуктов с высоким содержанием бора, в течение 1–2 ч после употребления.

Борная кислота хорошо абсорбируется через механически поврежденную поверхность кожи или через кожу, пораженную грибком, но не проникает через неповрежденную кожу.

T~1/2~ борат-иона варьирует от 12 до 27 ч. Бораты из организма выводятся в неизмененном виде в основном почками. 85–100% дозы, поступившей в организм, может быть выведено с мочой за 5–7 дней. Небольшое количество боратов найдено в поте и фекалиях.

Токсичность

Соединения бора имеют относительно низкую токсичность. Однако описано множество случаев острого и хронического отравления у детей и взрослых производными бора.

Признаки отравления проявляются диареей, рвотой.

Газообразные галоидные соединения бора действуют как сильно раздражающие средства. Длительное воздействие пыли, содержащей бораты, вызывает дерматиты, кашель, прерывистое дыхание у пострадавших.

Наблюдались случаи отравления боратами и со смертельным исходом. Смертельная доза для взрослого человека 15–20 г борной кислоты.

Бромиды

Объектами исследования служат кровь (10 мл), отобранная в пробирку с раствором ЭДТА; моча, помещенная в пластмассовый универсальный контейнер.

При посмертной экспертизе исследуют желудок с содержимым.

Качественное обнаружение

* При добавлении к части образца равного объема 5% раствора серебра нитрата образуется желтый осадок, который нерастворим 30% растворе азотной кислоты и малорастворим в растворе аммиака. * При добавлении к

части образца 5 мл раствора хлора и 3 мл хлороформа слой хлороформа окрашивается в желтый цвет, иодиды дают фиолетовый цвет, хлориды не реагируют.

Количественное определение

Существует много клинико-лабораторных методов определения хлоридов в сыворотке, которые также подходят для определения бромидов.

Предложен специфический метод колориметрического определения бромида, а также методики, основанные на применении газовой и жидкостной хроматографии, ионной хроматографии, КЭФ. Разработаны бромид-селективные электроды, способные определять уровень бромидов в плазме крови.

Токсичность

При остром отравлении наблюдается «бромистое оглушение» с ослаблением внимания к внешним воздействиям, расстройством походки, затруднением речи. Острая интоксикация бромидами сопровождается тошнотой, рвотой и диареей.

Хроническая интоксикация развивается в течение 2–4 нед и трудно диагностируется. При хронической интоксикации бромидами их концентрация в крови составляет 500–4280 мг/л.

Отравление бромидами может вызвать неврологические заболевания (атаксия, автономное возбуждение, ухудшение познавательных способностей). При хронической интоксикации соединениями брома на производстве, при длительном приеме препаратов, содержащих бромиды, или их индивидуальной непереносимости могут развиваться различные симптомокомплексы, известные как бромизм и бромодерма.

Причины избытка бромидов:

* избыточное поступление; * нарушение регуляции обмена бромидов.

Основные проявления избытка бромидов:

* кожная сыпь; * пустулы, мягкие воспалительные узлы фиолетово-красного цвета; * ринит; * бронхит; * нарушения пищеварения; * расстройства сна и речи; * снижение памяти и другие неврологические нарушения.

Антагонистами бромидов являются иодиды, фториды, хлориды, алюминий.

Хлораты

К объектам исследования относятся кровь (10 мл в пробирке с раствором ЭДТА), моча (20 мл), рвотные массы, желудок с содержимым, а также вещественные доказательства.

Качественное обнаружение

* При добавлении к части образца 1 мл 1% раствора индиго в разбавленной серной кислоте наблюдается темно-синее окрашивание. * К 5 мл рвотной массы добавляют 5 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты и фильтруют. Делят фильтрат на две равных части. К первой части добавляют 2 мл анилина и 1 мл соляной кислоты на 1 мл образца — наблюдается сине-зеленое окрашивание. Ко второй части добавляют 2 мл 1% раствора дифениламина в серной кислоте — наблюдается синее окрашивание

При внесении хлоратов в кровь она окрашивается в коричневый цвет из-за образования метгемоглобина. При добавлении к 1 мл такой крови 2 капель раствора цианида калия немедленно происходит окрашивание в красный цвет, что подтверждает присутствие метгемоглобина. Однако этот тест не является специфичным для хлоратов, поскольку и другие вещества, обладающие окислительной способностью, будут давать такой же результат. Необходимы подтверждающие исследования.

Количественное определение

В клинических случаях отравления хлоратами диагноз основан на измерении уровня метгемоглобина, которое легко выполняется как часть обычного биохимического анализа.

Метод ионной хроматографии для прямого анализа хлората в биожидкостях и тканях позволяет идентифицировать хлорат среди других анионов: нитрата, бромата и фосфата.

Оксалаты

Щавелевую кислоту определяют в биологических жидкостях методом ГХ в виде эфиров, биохимическими методами, комплексонометрическим титрованием, колориметрией, флюорометрией.

В организме оксалаты образуются из аскорбиновой кислоты, поступающей из пищи (35–44%), при биотрансформации глицина (40%) и в наименьшем количестве из других метаболических источников.

Естественное содержание оксалата в мозге составляет 0,6 мг/кг, в печени — 2,3 мг/кг, в почках — 4,0 мг/кг. Концентрации оксалата в сыворотке крови человека в среднем составляют 1,4 мг/л. Верхняя граница нормы в сыворотке равна 2,4 мг/л. В ЖКТ всасывается только 2–5% щавелевой кислоты. До 99% введенной дозы оксалатов выделяется с мочой в течение 36 ч.

При приеме внутрь оксалаты оказывают местное раздражающее действие и вызывают гипокальциемию, из-за осаждения кальция. Это свойство позднее было использовано при добавлении оксалатов в пробы крови в качестве антикоагулянтов.

При наружном воздействии щавелевой кислоты возникает раздражение кожи и глаз. Оксалаты повреждают почки и снижают уровень кальция в плазме, что может привести к шоку, коллапсу и судорогам. Смертельная доза при оральном приеме оксалата натрия составляет 15–30 г.

Отравления детей часто наблюдаются после употребления листьев ревеня (а не стеблей), которые содержат до 1% щавелевой кислоты.

Примеры. Двум мужчинам потребовался гемодиализ в связи с развитием острой почечной недостаточности из-за употребления сока плода *Averrhoa carambola*, содержащего 0,8% щавелевой кислоты.

Сообщалось об одном случае отравления из-за хронического профессионального воздействия паров щавелевой кислоты, признаками которого были тяжелая головная боль, рвота, снижение чувствительности, анемия и крайнее истощение.

После приема в пищу гидрооксалата калия 4 женщинами концентрация оксалата в плазме через 6 ч у 1 оставшейся в живых была 3,7 мг/л, в то время как у 3 умерших она составила 18–110 мг/л.

Щавелевая кислота и ее соли применяют в промышленности и быту как чистящие и отбеливающие средства. Оксалаты присутствуют в относительно высоких концентрациях в некоторых растениях, используемых в пище: шпинате, ревене и чае.

ПДК в воздухе промышленных предприятий щавелевой кислоты 1 мг/м^3^.

7.7. Фтор и его соединения

А твоего Солнца хватит на десять Африк.
А твоего холода — на несколько Антарктид…

Роберт Иванович Рождественский (1932–1994),
известный советский поэт

Соединения фтора используют в металлургии и химической промышленности. *Фтороводород* является основным сырьем для получения неорганических фторидов и фтороуглеводородов, реагентов для травления металлов и стекла, катализаторов для ряда органических реакций. *Кремнефтороводородную кислоту* H~2~SiF~6~ и ее соли используют для пропитки древесины, получения фторсиликатов и фторидов металлов.

В медицине фторсодержащие препараты применяют для лечения гипофтороза, используют как средства для наркоза, кровезаменители и т.д. Радиоактивные изотопы фтора используют в медико-биологических исследованиях.

Фториды присутствуют в разных количествах в почве и естественных водных запасах, почти во всех растениях. Оптимальное содержание фторидов в воде, по данным ВОЗ, 1 мг в 1 л. Фториды добавляют в воду и зубную пасту для профилактики зубного кариеса.

Соединения фтора поступают в организм человека с пищей и водой. Фториды содержатся в рисе, говядине, яйцах, молоке, луке, шпинате, яблоках и других продуктах, особенно ими богаты чай (100 мкг / г) и морская рыба (5–10 мкг / г).

В организме человека фториды находятся как в связанном состоянии, обычно в виде труднорастворимых солей кальция, магния, железа, так и в виде фторид-ионов. Фториды входят в состав всех тканей, причем *99%* фторидов приходится на кости и зубную эмаль. Фториды необходимы для нормального роста и развития организма, участвуя во многих важных биохимических реакциях.

Токсичность

Газообразный фтор (F~2~) и *фтороводород* — сильные раздражающие яды. При вдыхании эти соединения вызывают ожоги слизистых оболочек рта, гортани, бронхов, легких, сопровождающиеся острой болью. Возможны приступы удушья, лихорадка, одышка, цианоз и отек легких.

Производные *фторуксусной кислоты* (CH~2~FCOOH) также являются высокотоксичными веществами. Термин «фторацетаты» объединяет многочисленные производные фторуксусной кислоты. Некоторые фторацетаты используют в качестве родентицидов. Действие фторацетатов связано с блокированием цикла трикарбоновых кислот. *Смертельная доза* фторацетата натрия около 50 мг.

Фторированные углеводороды (фреоны, фторотан, тефлон, фторопласт) сравнительно малотоксичны.

Токсикологически значимые соединения фтора:

* натриевая соль фтороводородной кислоты (NaF); * натриевая соль кремнефтороводородной кислоты (Na~2~SiF~6~).

Отравления производными фтороводородной кислоты в большинстве случаев вызваны ошибочным применением их в быту вместо других солей.

При избыточном содержании фторидов в организме возникает хроническая фтористая интоксикация — *флюороз.* При этом заболевании развивается поражение костной системы по типу диффузного остеосклероза: нарушается синтез коллагена, происходят дегенеративно-дистрофические изменения в хрящевой и костной тканях, нарушается остеогенез. В связи с этим повышается содержание оксипролина в моче. Между содержанием оксипролина и фторидов в моче отмечают прямую зависимость, поэтому *содержание оксипролина в моче считают биомаркером воздействия.* При флюорозе страдают печень, почки, центральная нервная, сердечно-сосудистая и нейроэндокринная системы.

Избыточное поступление фторидов нарушает белковообразующую функцию печени (в сыворотке крови повышается содержание β-глобулинов и альбуминов, гаптоглобина), биосинтез и обмен андрогенов и эстрогенов, снижает содержание инсулина в сыворотке крови.

Фториды *угнетают метаболизм иода* в организме. Низкий уровень Т3 является ранним *диагностическим признаком хронической фтористой интоксикации*, а также причиной функциональной неполноценности Т-клеточного звена иммунитета. Хроническая интоксикация обычно развивается при употреблении питьевой воды с повышенным содержанием фторидов (более 4,5 мг / л).

На ранней стадии флюороза происходит увеличение количества В-лимфоцитов, что расценивается как защитно-компенсаторная реакция. При продолжительной интоксикации отмечаются дисфункция синтеза антител, снижение

содержания IgG, IgM и повышение содержания IgA. Возникают иммунологически опосредованные реакции в форме латентной сенсибилизации или профессионально обусловленных дерматозов.

Фториды обладают повышенной *онкопатогенностью* вследствие экспрессии супрессорного звена иммунной системы.

Длительное воздействие соединений фтора — один из факторов риска развития артериальной гипертонии, нарушений липидного обмена, при этом повышается содержание холестерина и липопротеинов высокой плотности в сыворотке крови.

Угнетающее действие фторидов на активность ряда ферментов сопровождается нарушением межуточного обмена в тканях (активация ресинтеза АТФ, угнетение гликолиза, синтеза ядерных РНК и белков).

Степень изменения уровня биомакеров в моче и крови зависит от концентрации фторидов в биосредах. Биологически значимые изменения в организме человека начинаются при концентрации фторидов в крови более 0,3 мг / л. Однако более надежным биомаркером воздействия считают содержание фторидов в моче, волосах и слюне.

Флюороз костей развивается, как правило, *через 10–20 лет* хронического воздействия фторидов.

Причины избытка фтора:

* избыточное поступление фтора в организм с питьевой водой (некоторые районы севера России, окрестности предприятий по производству алюминия); * хроническая интоксикация плавиковой кислотой и другими соединениями фтора в производственных условиях; * длительная передозировка препаратов фтора; * нарушение регуляции обмена фтора.

При хронической интоксикации фтором рекомендуется ограничить поступление его в организм и проводить симптоматическое лечение.

Основные проявления избытка фтора:

* меловидные пятна на зубах, разрушение зубной эмали, хрупкость зубов, остеосклероз (флюороз); * остеомаляция, остеопороз, кальциноз сухожилий и связок, образование костных шпор; * кровоизлияния в десну, слизистые оболочки рта и носа; * потеря голоса, сухой удушливый кашель; * брадикардия, снижение артериального давления; * кожный зуд, раздражение и слущивание эпидермиса; * нарушение жирового и углеводного обмена.

Токсикокинетика

При пероральном поступлении хорошо растворимые соединения фтора всасываются из ЖКТ в кровь на 93–97% в результате пассивной диффузии, усваивается организмом около 80% фторидов. Всасываемость фторидов зависит не только от растворимости их солей, но и от содержания кальция и магния в организме. Магний тормозит усвоение фторидов.

В крови фториды связываются в незначительной степени *с альбуминами*. Основным местом *депонирования* фторидов в организме являются кости и зубы. Максимальную концентрацию фторидов регистрируют в цементе зуба, несколько меньшую в твердой костной ткани, дентине и эмали зуба. В минеральной фракции костей фториды включены в кристаллическую решетку солей и частично локализуются на поверхности кристаллов гидроксиапатита.

Выведение фторидов из организма осуществляется главным образом с мочой, частично с калом и пóтом. У здорового человека существует прямая корреляция между содержанием фтора в потребляемой питьевой воде и выведением его с мочой.

Токсикокинетические характеристики фторидов представлены в табл. 7-19.

Токсическая доза фторидов для человека 20 мг. *Летальная доза* фторида натрия 5–10 г. При летальном исходе концентрация фторидов в крови 15 мг / л, в моче — 211 мг / л.

Индикатором содержания фторидов в организме является *концентрация в моче.*

Таблица 7-19. Токсикокинетические характеристики фторидов

Суточное поступление с продуктами питания	До 2 мг
Резорбция ЖКТ	~90–97%
Суточное выведение: * моча * кал * пот * прочие (волосы и др.)	1 мг 0,2 мг 0,65 (в жарком климате) –
Период полувыведения (*T*~½), ч~	2–9 ч
Объем распределения (*V*~d~), л/кг	0,5–0,7 л / кг
Связывание с белками плазмы (Fb)	0
Среднее содержание: организм человека массой 70 кг	2–3 г
* кости	112–310 мг / кг
* кровь	0,01–0,03 мг / л
* плазма / сыворотка	0,007–0,022 мг / л
* молоко	0,007–0,017 мг / л
* моча	0,5 мг/ л
* волосы	53–72 мг / кг
* зубы (эмаль)	140–157 мг / кг
* зубы (дентин)	293–340 мг / кг
* печень	0,2–0,8 мг / кг
* почки	0,2–0,8 мг / кг
* мозг	0,2–0,8 мг / кг
* легкие	0,2–0,8 мг / кг

Методы определения

Объектами исследования служат кровь, отобранная в количестве 10 мл в пробирку с раствором ЭДТА, моча в количестве 20 мл, рвотные массы. Часто определяют фториды в волосах и зубах.

Фториды можно изолировать методом *минерализации* биологического материала. После подщелачивания избытком NaOH биопробу смачивают раствором концентрированной серной кислоты или нитрата аммония и сжигают при температуре не выше 500 °С. *Современные методики минерализации* (см. гл. 4) используют для последующего применения методов элементного анализа (например, ИСП-МС).

Качественное обнаружение.

* К части образца добавляют 25% раствор хлорида кальция. Фториды дают белый желатиновый осадок, который нерастворим в 30% растворе уксусной кислоты, и мало растворим в разведенной соляной кислоте. * Так называемый метод травления стекла.

Часть мочи или рвотной массы сушат, растворяют и нагревают с гидроксидом кальция. Добавляют 0,2 г очищенного песка, переносят в выпарительную чашку. Наносят мазок мягким парафином на стеклянную пластину, делают любую пометку (опознавательный знак на парафиновом слое). Добавляют 5 мл серной кислоты в выпарительную чашку, пластиной (парафиновый слой обращен к чашке) закрывают чашку и нагревают в течение 20 мин. Удаляют парафиновый слой с пластины. Оставленный след на пластине, соответствующий сделанному опознавательному знаку, указывает на присутствие фторидов.

Количественное определение. Используют разные методы анализа, однако чаще применяют метод парофазного анализа (см. п. 7.1 и 7.2) в комбинации ГХ-ПИД-ЭЗД. Для этого содержащиеся в моче или сыворотке крови фториды экстрагируют триметилхлорсиланом, переводя реакционноспособный фторид в инертное летучее производное — триметилфторосилан. Такой подход дает возможность определять фториды при их содержании 10–50 нг / л (в среднем около 15 нг / л).

Все большее применение в элементном анализе при токсикологических исследованиях находит метод ИСП-МС.

Проводят определение фторидов с помощью ионоселективного электрода, однако этот метод требует тщательной калибровки электродов.

Для количественного определения фторидов в биологических жидкостях предлагаются многочисленные колориметрические и спектрофотометрические методы, некоторые из которых очень трудоемки.

Глава 8. Допинговые средства

Говорят, что между двумя противоположными
мнениями находится истина. Ни в коем случае!
Между ними лежит проблема.

Иоганн Вольфганг Гете (1749–1832), великий немецкий писатель, поэт, философ, художник, естествоиспытатель

Постоянный рост рекордов в спорте высших достижений вынуждает спортсменов подвергать себя высочайшим по интенсивности нагрузкам, которые зачастую превышают адаптационные возможности человеческого организма. Нередки случаи, когда спортсмены и специалисты в области спорта изыскивают всевозможные неблаговидные способы для улучшения физических возможностей и работоспособности атлета при помощи допинговых средств. Так, использование субстанций и/или методов, наносящих вред здоровью спортсменов и нарушающих принципы спортивной этики, принято классифицировать как допинг.

Применение допинговых средств в спорте запрещено.

Несмотря на исключительно активную борьбу с применением допинга, которую ведет Международный олимпийский комитет уже более 50 лет, проблема использования запрещенных веществ и методов в спорте не решена и с каждым годом приобретает все бóльшую остроту.

8.1. Основные допинговые средства

Видя чужие пороки,
умный избавляется от своих.

Публий Сир (I в. до н.э.), древнеримский мимический поэт эпохи Цезаря, раб, получивший впоследствии свободу

Запрещенный Список (далее – Список), установленный и ежегодно обновляемый Всемирным антидопинговым агентством (ВАДА), предоставляет актуальный перечень контролируемых субстанций и методов, запрещенных к употреблению спортсменам во всех видах спорта, включая субстанции, применение которых не разрешено только в соревновательный период или чей прием ограничен только в отдельных видах спорта.

Всемирный антидопинговый кодекс ВАДА определил основные положения, касающиеся включения субстанций и методов в Список.

1. В Список должны быть включены субстанция или метод, отвечающие любым двум из трех следующих критериев:

* данная субстанция или метод способны улучшать или улучшают спортивные результаты (на основании научно обоснованных данных или предыдущего опыта); * данная субстанция или метод представляют риск, в том числе

потенциальный, для здоровья спортсмена (на основании научно обоснованных данных или предыдущего опыта); * использование данной субстанции или метода противоречит духу спортивных состязаний.

2. Субстанция или метод также должны вноситься в Список, если ВАДА определяет, что существуют медицинские или другие научные данные, фармакологический эффект или опыт, свидетельствующие о том, что данная субстанция или метод способен маскировать использование других запрещенных субстанций и запрещенных методов.

3. Решение ВАДА о включении той или иной субстанции или метода в Список *окончательно* и не может быть предметом обсуждения со стороны спортсмена или другой персоны на основании того, что данная субстанция или метод не является маскирующим агентом, не может улучшать результаты, не несет риска для здоровья или не противоречит духу спортивных состязаний.

Основные классы допинговых средств включают широкий набор субстанций и методов.

Список включает запрещенные субстанции:

* неодобренные субстанции (субстанции, не относящиеся к ниже представленным группам и в настоящее время не одобренные к применению в качестве терапевтических средств); * анаболические агенты (экзогенные, эндогенные, метаболиты и изомеры, а также другие анаболические агенты); * пептидные гормоны, факторы роста, подобные субстанции и миметики (эритропоэтины и агенты, влияющие на эритропоэз; пептидные гормоны и их рилизинг-факторы, факторы роста и модуляторы факторов роста); * бета-2-агонисты; * гормоны и модуляторы метаболизма (ингибиторы ароматазы; антиэстрогенные субстанции; агенты, предотвращающие активацию рецептора активина IIB; модуляторы метаболизма); * диуретики и маскирующие агенты.

Список включает запрещенные методы:

* манипуляции с кровью и ее компонентами; химические и физические манипуляции (фальсификации с целью нарушения целостности и подлинности проб, взятых при допинг-контроле; внутривенные инфузии и/или инъекции); * генный и клеточный допинг.

В дополнение к категориям, перечисленным в пунктах выше, во время соревнований запрещены следующие категории:

* стимуляторы (специфические и неспецифические); * наркотики; * каннабиноиды; * глюкокортикоиды; * бета-блокаторы.

В отношении ряда веществ имеются *ограничения*, т. е. они запрещены *в определенных условиях, в отдельных видах спорта.*

Следует указать, что на сегодняшний день ВАДА не предоставляет единые методики определения, включенных в Список субстанций и методов, а лишь указывает требования, необходимые для соблюдения аккредитованными антидопинговыми лабораториями. Разработанный ВАДА международный стандарт для лабораторий служит для получения обоснованных результатов тестирования проб, а также для гармонизации и единообразия отчетности всех аккредитованных лабораторий.

При создании новых методик и актуализации уже разработанных основной упор делается на поиск долгоживущих метаболитов оцениваемых субстанций, а также на понижение нижнего предела их определения. Кроме того, одним из краеугольных аспектов антидопингового анализа является определение случаев употребления спортсменами эндогенных субстанций.

8.1.1. Анаболические агенты

Андрогенные анаболические стероиды относятся к производным мужского полового гормона тестостерона и представляют собой наиболее распространенный в спортивной практике класс запрещенных субстанций, чаще всего выявляемых в ходе антидопингового тестирования. Так, в 2020 г., по данным ВАДА, 47% положительных проб содержали анаболические стероиды, из которых 9,5% представляли собой эндогенные стероиды экзогенного

происхождения. Воздействие анаболических стероидов идентично воздействию тестостерона и проявляется *анаболическими* (изменение структуры и объема мышечной ткани) и *андрогенными* (рост волос по мужскому типу, ускорение процесса полового созревания, огрубление голоса и др.) эффектами. Анаболическое действие андрогенных анаболических стероидов преимущественно сказывается на мышцы, кости, сердце и почки, где они способствуют синтезу белка, росту мышечных волокон, эритропоэзу. Кроме того, андрогенные анаболические стероиды стимулируют рост мышечной массы за счет подавления катаболизма белка в мышцах.

Повышение уровня кортизола, отмечаемое у спортсменов высокого класса в период наиболее напряженной подготовки, снижает содержание гликогена в мышцах и усиливает расщепление белков. Применение тестостерона противодействует этому. Соотношение содержания тестостерона и кортизола в организме определяет направление метаболических процессов в мышцах — синтез или распад белков. Во многом этим обусловлено широкое распространение стероидных препаратов в качестве допинга. В настоящее время количество положительных проб на тестостерон при допинг-контроле находится в прямой зависимости от вида спорта: наибольшее количество случаев применения андрогенных анаболических стероидов фиксируется в тяжелой атлетике, велоспорте, легкой атлетике, бодибилдинге.

Значимые эффекты использования андрогенных анаболических стероидов достигаются зачастую только при длительном приеме препаратов. Наиболее опасным является их бесконтрольный прием в больших дозах, что распространено в спорте высших достижений. Терапевтическая доза анаболических стероидов при пероральном приеме (5–10 мг/сут) нередко превышается в десятки и даже сотни раз — 300–2000 мг/сут. Проблема усугубляется тем, что применение андрогенных анаболических стероидов обычно сопровождается использованием других сильнодействующих препаратов для сокрытия следов применения или предупреждения нежелательных эффектов. Одновременно даже небольшие дозы анаболических стероидов снижают естественное производство тестостерона, нанося вред организму и не предоставляя ожидаемого спортсменом результата, в то время как выраженный эффект проявляется *только при приеме больших доз* препаратов.

Избыточное применение анаболических стероидов, характерное для современного спорта, вызывает:

* изменения метаболизма соединительной ткани и снижение прочности сухожилий и связок, увеличение риска их разрывов; * структурно-функциональные изменения костной ткани, что чревато переломами; * подавление функции иммунной системы; * развитие онкологических заболеваний, в частности рака печени и предстательной железы; * нарушение психического состояния (агрессивность и излишняя импульсивность); * нарушение (у молодых спортсменов) роста эпифизарных хрящей, преждевременному формированию скелета, замедлению роста тела; * нарушение репродуктивной функции (часто необратимого характера).

У мужчин применение анаболиков подавляет естественное производство тестостерона в организме со всеми вытекающими отсюда последствиями: дистрофией половых желез, импотенцией, изменением по женскому типу, например увеличением грудных желез. У женщин прекращается менструальный цикл, грубеет голос, появляются волосы на лице и др.

«Я по-прежнему утверждаю, что запретами ничего не добьешься. Если вы хотите победить эту болезнь, дайте людям пищу для ума, установите шкалу преуспеяния, несводимую к некоторой сумме в долларах, а основанную на вечных ценностях, одним словом — образовывайте их» — это слова, сказанные по поводу наркомании Алистером Кроули (1875–1947), безусловно должны быть услышаны и спортсменами, и тренерами. Нередко спортсмены, приобретая анаболические стероиды, пользуются услугами черного рынка, что может привести к трагическим последствиям.

Метод ГХМС является основным инструментальным подходом, применяющимся для анализа андрогенных анаболических стероидов в допинговом контроле. Скрининговые методики их определения насчитывают свыше 100 стероидных субстанций и метаболитов, рутинно определяемых в ходе анализа.

Значительный вклад в изучение особенностей применения стероидов в допинге внесла научная группа немецкого профессора Доннике. В частности, было выявлено отсутствие влияния введенного изотопономеченного тестостерона на концентрацию эпитестостерона, в связи с чем соотношение тестостерона к эпитестостерону (T/E)

до сих пор принято считать одним из основных маркеров приема тестотстерона. Так, если соотношение T/E в анализируемой пробе больше либо равно четырем, такой результат принято считать атипическим.

Стероидный профиль спортсмена

Продолжительный прием андрогенных анаболических стероидов значительно понижает выработку собственных гормонов. Также было установлено, что концентрация и соотношение в моче тестостерона и его ряда неактивных метаболитов (эпитестостерона, андростерона, этиохоланолона, 5α-андростан-3α, 17β-диола и 5β-андростан-3α, 17β-диола) особенно чувствительны к приему эндогенных стероидов, в связи с чем было принято проводить их анализ в рамках исследований стероидного профиля спортсмена. Постоянный мониторинг стероидного профиля позволяет выделить индивидуальные референсные диапазоны исследуемых соединений. При непопадании одного из измеряемых показателей стероидного профиля в референсные границы результат принято считать атипическим и требующим дополнительного анализа методами изотопного анализа. В случае когда изотопный анализ не выявил запрещенные субстанции, референсный диапазон для данного атлета увеличивается. Следует учитывать, что количественную оценку стероидного профиля необходимо проводить с учетом диуреза (корректировки плотности мочи на 1,02).

Применение метода изотопной МС

При выявлении атипического результата анализа (нарушение референсных границ стероидного профиля или T/E>4) проводится дополнительный анализ методом газовой хроматографии-сжигания-изотопной МС (ГХ/С/ИМС). В силу того что содержание изотопа ^13^C в применяемых синтетическом тестостероне значительно ниже, чем в эндогенном, природу происхождения стероида в моче атлета становится возможным определить при помощи изотопного анализа. Данный инструментальный метод основан на изучении разницы между изотопным соотношением ^13^C/^12^C в целевых стероидах и изотопным соотношением ^13^C/^12^C эндогенных маркеров (ЭМ) — |Δδ^13^C|. В отличие от целевых соединений концентрация эндогенных маркеров не меняется в ответ на прием анаболических стероидов. В качестве основного эндогенного маркера ВАДА обязует лаборатории использовать прегнандиол, а в качестве дополнительных маркеров — 5α-андрост-16-ен-3α-ол, 11β-гидроксиандростерон, 11-кето-этиохоланон. Определяемые целевые соединения должны как минимум включать маркеры стероидного профиля. Например, тестостерон, 5α-андростан-3α,17β-диол и 5β-андростан-3α,17β-диол являются основными целевыми соединениями для установления факта приема атлетом тестостерона.

Результат ГХ/С/ИМС анализа может быть:

* отрицательным, если анализ не выявил факта экзогенного введения субстанции (субстанций); * неблагоприятным, если результаты ГХ/С/ИМС анализа согласуются с экзогенным введением стероида (стероидов) с указанием подлинности соответствующего целевого соединения; * атипическим, если результаты ГХ/С/ИМС неубедительны и указана подлинность соответствующего целевого соединения.

Критерии по принятию пробы положительной в ходе изотопного анализа объединены в табл. 8-1.

Таблица 8-1. Критерии принятия пробы положительной при проведении изотопного анализа для тестостерона (Т); эпитестостерона (Эпи); андростерона (Андро); этиохоналона (Этио); 5α-андростан-3α,17β-диола (5α-А-диол); 5β-андростана-3α, 17β-диола (5β-А-диол), болденона (Б), андростендиона (Андрост)

	|Δδ^13^C|ЭМ-ЦС					
№ полож. случая	**Т**	**Эпи**	**Андро**	**Этио**	**5α-А-диол, 5β-А-диол**	**Б, Б М1, 6α-ОН-андрост, эпиандростерон^*^**
1	>3,0‰				>3,0‰ (для одного А-диола)	
2					>3,0‰ (оба А-диола)	
3		>4,5‰				
4			>2,0‰	>3,0‰		
5			>2,0‰		>3,0‰	
6				>3,0‰	>3,0‰	

7	
8	>4,0‰

Схема выбора и использования эндогенных маркеров представлена на рис. 8-1. Проба считается отрицательной, если результат анализа прегнандиола в качестве ЭМ – отрицательный. В случае если прегнандиол невозможно измерить в пробе, он заменяется на дополнительный ЭМ, установленный ранее лабораторией.

Неблагоприятный результат выдается лабораторией, если оба ЭМ, включая прегнандиол и дополнительный ЭМ, установленный лабораторией, выдали положительный результат.

Проба считается атипической, если:

* результат анализа основного ЭМ — неубедительный; * промежуточный результат изотопного анализа с использованием прегнандиола и дополнительного ЭМ отрицательные или неубедительные, а значения |Δδ^13^C| обоих ЭМ не согласуются с эндогенным происхождением целевого стероида, и лаборатория не подтвердила наличие третьего ЭМ; * при анализе дополнительного ЭМ для подтверждения промежуточного положительного результата ГХ/С/ИМС, полученного при анализе основного ЭМ, промежуточные результаты ГХ/С/ИМС при использовании двух ЭМ не согласуются друг с другом (например, если промежуточные результаты основного ЭМ положительные, но анализ дополнительного ЭМ — отрицательный или неубедительный); * недостаточный объем пробы для повторного анализа ГХ/С/ИМС с использованием третьего ЭМ.

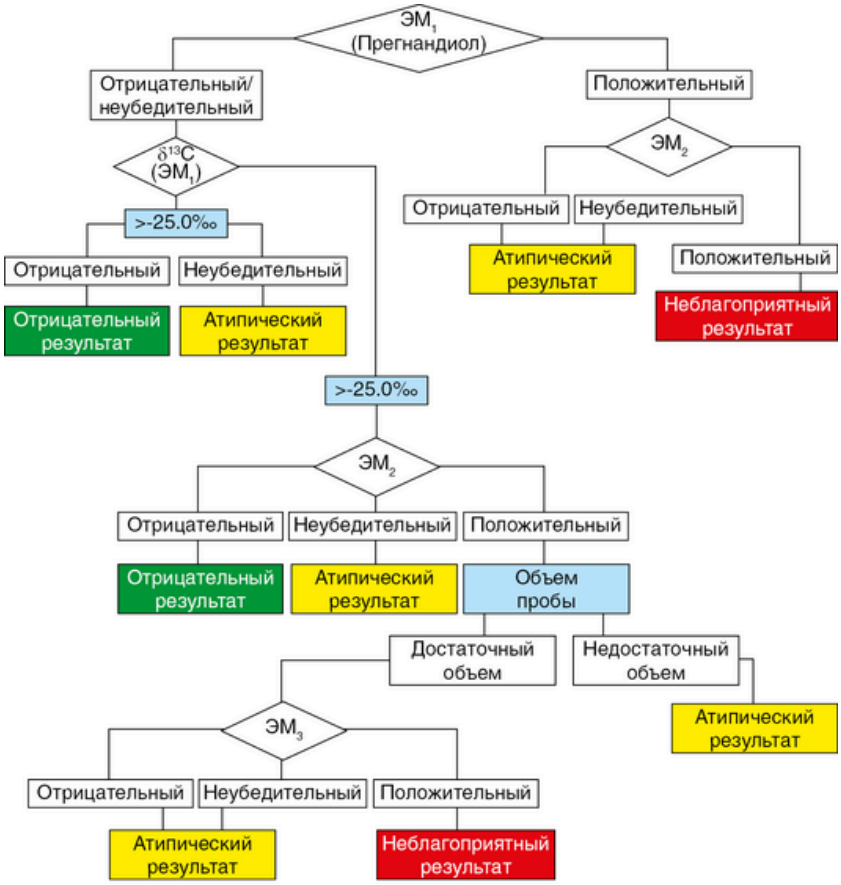


Рис. 8-1. Схема выбора и использования эндогенных маркеров

8.1.2. Пептидные гормоны, факторы роста, связанные с ними субстанции и миметики

Агонисты рецепторов эритропоэтина

В последние несколько десятилетий в спорте значительно возросло число случаев злоупотребления стимуляторами кроветворения, такими как эритропоэтин (ЭПО) и его аналоги. ЭПО является эндогенным пептидным гормоном, ответственным за регуляцию выработки эритроцитов в костном мозге, а также за содержание гемоглобина и эритроцитов в крови. За счет повышения концентрации гемоглобина в крови эритропоэтины улучшают перенос кислорода клеткам, в том числе мышечным, что позволяет работать мышцам эффективнее, увеличивая их

аэробные возможности. В этой связи эритропоэз-стимулирующие агенты активно используются спортсменами в качестве допинга.

В настоящее время определение ЭПО-допинга возможно прямыми методами на основе гель-электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом или лауроилсаркозинатом натрия, а также методами иммуноферментного или масс-спектрометрического анализа. Кроме того, существует и непрямой метод определения фактов злоупотребления эритропоэз-стимулирующими агентами, основанный на изучении гематологического профиля биологического паспорта спортсмена на протяжении длительного времени, при котором проводится статистический анализ данных профиля по косвенным маркерам (гематокрит, гемоглобин, процентное содержание незрелых ретикулоцитов и т.д.).

Соматотропный гормон

Интенсивное использование в спортивной практике гормона роста (ГР) — *соматотропного гормона* (соматотропина) началось в 80-х годах XX в. после запрета анаболических стероидов. Пептидный гормон соматотропин вырабатывается в передней доле гипофиза под контролем соматостатина и соматолиберина. Основные его функции — стимуляция линейного роста, поддержание целостности тканей и уровня глюкозы крови, достаточного для функционирования головного мозга. Соматотропин имеет широкий спектр действия:

* ускоряет синтез белка, задерживая в организме азот и фосфор и обеспечивая их положительный баланс за счет снижения уровня мочевины; * ускоряет рост костей и мягких тканей, действуя через инсулиновые факторы роста; * тормозит выведение натрия и калия с мочой; * усиливает всасывание кальция в кишечнике; * стимулирует расщепление жиров в жировой ткани и ускоряет поглощение жирных кислот из крови мышечной тканью и печенью (где они преобразуются в глюкозу); * препятствует поглощению глюкозы тканями, оказывая влияние на уровень глюкозы крови, противоположное действию инсулина; * увеличивает количество Т-лимфоцитов.

Кроме того, соматотропин ускоряет синтез других стимуляторов роста, прежде всего соматомедина. Уровень соматомедина в свою очередь влияет на секрецию соматотропного гормона гипофизом (эффект многократного усиления). В спортивной практике соматотропин применяется в схемах по набору сухой мышечной массы с учетом выраженного анаболического и жиросжигающего действия, а также для повышения эффективности энергообмена при физических нагрузках. Для определения гормона роста применяют два подхода: метод определения изоформ гормона роста и измерение чувствительных маркеров гормона роста.

Эндогенный ГР состоит из нескольких изоформ, где 70% представляет собой полипептид с молекулярной массой, равной 22 кДа. Одновременно рекомбинантный ГР состоит только из **одной** изоформы с молекулярной массой 22 кДа, а отличные от нее изоформы отсутствуют. В этой связи изоформный метод базируется на измерении соотношения содержания изоформы с массой 22 кДа к общему содержанию ГР. К сожалению, изоформный метод обладает узким окном детектирования. Так, рекомбинантный ГР, даже в случае подкожного введения, выводится очень быстро и его невозможно определить в крови уже на следующее утро после введения.

Другой метод выявления злоупотребления ГР основан на выявлении его «маркеров». В этом случае оценивается содержание инсулин-подобного фактора роста – 1(ИФР-1) и N-конечного пропептида проколлагена III типа, концентрация которых увеличивается при введении ГР.

Рилизинг-пептиды ГР

К рилизинг-факторам ГР относят синтетические вещества, способные вызывать повышение производительности ГР. Выработка соматотропного гормона регулируется его секретагогами, отвечающими за контроль секреции в кровь тропных гормонов передней доли гипофиза. В последние годы наблюдается активный рост числа рилизинг-пептидов гормона роста (РПГР) и их аналогов на черном рынке допинговых препаратов, где они в некоторых случаях продаются под видом пищевых добавок. В этой связи современные антидопинговые лаборатории разрабатывают и совершенствуют методики определения РПГР, которые, в свою очередь, осложняются малыми принимаемыми дозами, высокой скоростью метаболизма и элиминации. РПГР стимулируют выработку ГР за счет связывания с рецептором грелина, локализованного в гипофизе. Помимо воздействия на выработку ГР, РПГР также

способны маскировать факт употребления рекомбинантного ГР. Идентификация РПГР и их метаболитов проводится преимущественно в образцах мочи методами ВЭЖХ-МС/МС с предварительной ЖЖЭ.

Хорионический гонадотропин, лютеинизирующий гормон

При продолжительном приеме андрогенных анаболических стероидов выработка собственных стероидов понижается, что приводит к уменьшению концентрации эндогенных стероидов в моче. Для нормализации содержания эндогенных стероидов спортсмены зачастую принимают хорионический гонадотропин (ХГЧ) или лютенизирующий гормон (ЛГ).

У мужчин ХГЧ наравне с ЛГ стимулируют выработку эндогенного тестостерона мужскими половыми клетками, что приравнивается к их применению. Поэтому прием ХГЧ и ЛГ запрещен только среди мужчин. Введение ХГЧ и ЛГ проводят для нормализации процессов выработки собственного тестостерона и зачастую используют во второй половине или по окончанию курса приема анаболических стероидов.

Наиболее распространенными методами для определения ХГЧ и ЛГ в моче спортсменов являются методы ИФА (см. п. 5.2.2.), однако существуют и методики, основанные на ВЭЖХ-МС/МС методах .

Рилизинг-гормоны гонадотропина

Помимо ХГЧ и ЛГ, косвенно влияющих на выработку тестостерона, нередки случаи злоупотребления рилизинг-гормонами гонадотропина (ГнРГ) и их агонистами. ГнРГ помимо эргогенного действия способны маскировать прием андрогенных анаболических стероидов за счет нормализации изотопных соотношений тестостерон/эпитестостерон и C^12^/C^13^ . ГнРГ и его агонисты оказывают двухфазное воздействие на гипоталамо-гипофизарно-гонадальную ось, одновременно обеспечивая стимулирующее действие на репродуктивную систему при кратковременном введении, и подавляющее действие при пролонгированном употреблении. В результате ГнРГ могут применяться как для увеличения мышечной массы, так и для восстановления уровней эндогенного тестостерона после приема андрогенных анаболических стероидов. Преимущественно определение ГнРГ в биологических жидкостях спортсмена проводят методами ВЭЖХ-МС/МС.

8.1.3. Бета-2-агонисты

Бета-2-агонисты содержатся в препаратах для лечения астмы. Они улучшают дыхание за счет расширения бронхов, а при употреблении в больших дозах стимулируют рост мышц. Могут применяться как перорально, так и ингаляционно. К наиболее распространенным бета-2-агонистам относят кленбутерол, формотерол и сальбутамол.

Астма — это хроническое воспалительное заболевание слизистой оболочки дыхательных путей. От 5 до 10% людей страдают этим заболеванием и вынуждены использовать астматические ингаляторы, содержащие бета-2-агонисты. Среди элитных спортсменов легкие или средние нарушения функции бронхов диагностируются заметно чаще, чем в среднем по популяции. Стоит отметить, что люди, не страдающие астмой, не получают каких-либо преимуществ при их употреблении, а только страдают от вызываемых ими побочных эффектов. В этой связи такие препараты стали реже применяться спортсменами в качестве допинга. В последние несколько лет антидопинговые правила, касающиеся запрещенных бета-2-агонистов, были смягчены, и на сегодняшний день бета-2-агонисты, содержащиеся в ингаляторах, разрешены к употреблению при условии, что их концентрация не превышает указанный порог.

8.1.4. Гормоны и модуляторы метаболизма

Данный класс запрещенных в спорте препаратов содержит различные субстанции, которые за счет воздействия на рецепторы или специфические ферментативные реакции оказывают влияние на регуляцию гормонального фона в организме. Гормоны и модуляторы метаболизма с антиэстрогенными эффектами (ингибиторы ароматазы, селективные модуляторы рецепторов эстрогена) обычно применяются в спорте для предотвращения побочных эффектов от приема анаболических стероидов. Ингибиторы ароматазы подавляют действие фермента ароматазы, превращающей тестостерон в эстроген. В то же время селективные модуляторы рецепторов эстрогена за счет связывания с рецепторами эстрогена блокируют его эффекты.

Ингибиторы миостатина также относятся к рассматриваемому классу допинговых субстанций. Миостатин является эндогенным белком, чье действие направлено на подавление бесконтрольного роста мышечной массы. Таким образом, ингибирование действия миостатина приводит к излишнему росту мышц.

AICAR и GW501516

К подклассу модуляторов метаболизма относят известные как «миметики физических упражнений», или «упражнение в таблетке», — AICAR и GW501516. Эти субстанции являются стимуляторами АМФ, т.е. активированной протеинкиназы, отвечающей за регуляцию метаболизма и активирующейся во время физической нагрузки или в других обстоятельствах, при которых необходимо использование клеточной энергии. Они стимулируют процессы окисления жирных кислот и способствуют ремоделированию мышц.

Инсулин

Инсулин — пептидный гормон эндогенного происхождения, вырабатывающийся в поджелудочной железе специализированными клетками (островки Лангерганса). Роль инсулина хорошо известна из курса биохимии. Полисахарид гликоген — это основная форма хранения глюкозы, являющейся источником энергии в организме. Введение рекомбинантного инсулина понижает уровень глюкозы в крови, увеличивая как ее усвоение клетками, так и аминокислот. Однако синтетический инсулин ингибирует выработку собственного инсулина. Применение инсулина в качестве допинга опасно для жизни атлета. В случае когда уровень глюкозы в крови падает ниже определенного предела, возможно наступление гипогликемической комы, имеющее серьезные последствия. Другой негативный эффект применения инсулина в качестве допинга — высокий риск развития диабета. Злоупотребление инсулином и инсулиномиметиками в спорте наблюдается преимущественно в силовых видах спорта зачастую в комбинации с курсами анаболических стероидов и гормона роста. В то время как анаболические стероиды и гормоны роста стимулируют рост мышц, инсулин ингибирует их распад. Более того, соматотропин понижает захват глюкозы мышечными клетками, что возможно компенсировать приемом инсулина. Инсулин в качестве допинга распространен еще и в циклических видах спорта (ходьба, бег, плавание и т.п.).

Наиболее распространенными формами инсулина, применяемого в качестве допинга, являются быстродействующие инсулины или аналоги инсулина (например, регуляр, лиспро, аспарт и т.д.). Измерение уровней С-пептида и проинсулина в плазме позволяет отличить эндогенную или экзогенную природу гиперинсулинемии. Так, концентрация в плазме С-пептида <200 пмол/Л и проинсулина <5 пмол/Л при уровне глюкозы <45 мг/дЛ, а также повышенных уровнях инсулина свидетельствует об экзогенном введении инсулина. На сегодняшний день существуют методы, способные различать инсулин человеческого происхождения от инсулина животного происхождения, а также их синтетических аналогов. Кроме того, ряд инсулиновых аналогов может быть определен в моче методом ЖХ тандемной МС.

Триметазидин

Начиная с 2014 г. лекарственный препарат триметазидин включен ВАДА в Список запрещенных допинговых агентов. Триметазидин является известным кардиологическим препаратом с доказанной биохимической и клинической активностью. В силу его фармакологических особенностей и механизмов действия, а также схожей химической структурой с другими запрещенными стимуляторами, например бензилпиперазином, он *предположительно* может применяться спортсменами для улучшения показателей физической выносливости.

Мельдоний

Мельдоний, первоначально нашедший свое применение в качестве противоишемического средства, в 2016 г. был включен в Список ВАДА в силу схожего с триметазидином действия на организм. Основанием для включения мельдония в Список стала его способность к повышению выносливости, ускоренному восстановлению и активации нервной системы. Ряд ученых и специалистов в области спорта заявляют об отсутствии каких-либо преимуществ у спортсменов, принимавших мельдоний.

8.1.5. Диуретики и другие маскирующие вещества

Диуретики воздействуют на процессы, происходящие в нефроне: клубочковую фильтрацию, канальцевую реабсорбцию, секрецию. Применение диуретиков не способствует повышению физической работоспособности и, следовательно, не может оказывать существенного влияния на спортивные результаты. Они используются в спортивной практике:

* для срочного снижения массы тела в таких видах спорта, как тяжелая атлетика, бокс, различные виды борьбы, спортивная и художественная гимнастика и др.; * для сокрытия применения запрещенных фармакологических препаратов, так как увеличенный объем мочи и ее повышенная экскреция способствуют интенсивному выведению химических веществ.

Поскольку применение диуретиков приводит к значительной потере воды организмом и снижению массы тела и в то же время не сказывается отрицательно на выносливости спортсмена и его скоростно-силовых возможностях, то можно ожидать повышения результатов во многих видах спорта. Эффект еще более возрастает, если прием диуретиков сочетается со специальными диетами.

Недопустимо применение диуретиков в видах спорта, связанных с проявлением выносливости и/или требующих большого расхода кислорода.

Прием диуретиков приводит к значительному снижению объема плазмы крови, систолического и сердечного выброса, что снижает работоспособность. В отдельных видах спорта этот эффект применения диуретиков может усугубляться дегидратацией организма вследствие продолжительных интенсивных физических нагрузок, особенно в условиях жаркого климата.

Комментарий ВАДА

Разрешение на терапевтическое использование запрещенных субстанций не действует, если моча спортсмена содержит диуретик вместе с пороговым или субпороговым уровнем запрещенной субстанции.

8.1.6. Запрещенные методы

Никогда не ищи сложных путей там,
где есть простая дорога.

Эрих Мария Ремарк (1898–1970), известный немецкий писатель
Манипуляции с кровью и ее компонентами

В последние десятилетия в спорте получил широкое распространение так называемый кровяной допинг, или кровяная поддержка, кровяная загрузка, индуцируемая эритроцитемия.

Установлено, что забор у спортсмена порций крови (около 400 мл) с последующим введением в организм через 3–4 нед или более приводит к увеличению максимального потребления кислорода на 8–10%. Кровяной допинг может быть достигнут разными способами, одним из которых является гомологическая трансфузия — получение от донора крови с необходимыми для ее переливания характеристиками. Второй способ называется аутогемотрансфузией; при аутогемотрансфузии спортсмену вводят его же собственную кровь.

За 1 мес количество эритроцитов в организме восстанавливается до нормального. Для сохранения эритроцитов отобранной крови их осаждают центрифугированием, отделяют от плазмы и замораживают. Впоследствии размораживают и смешивают с солевым раствором для ускорения трансфузии. При введении общее количество крови в организме спортсмена возрастает, что вызывает повышение артериального давления и как следствие выведение почками воды из плазмы, однако при этом эритроциты остаются в кровяном русле и количество эритроцитов в крови возрастает. С увеличением концентрации эритроцитов и, соответственно, концентрации гемоглобина возрастает способность крови доставлять к работающим мышцам большее количество кислорода.

Специалисты считают, что использование донорской крови связано с определенным риском, так как, несмотря на тщательный подбор крови по группам, некоторые лица (3–4%) отрицательно реагируют на переливание крови в связи с разрушением трансфузированных эритроцитов. Не исключаются также случаи возникновения инфекционных заболеваний. Избежать этих отрицательных влияний позволяет забор, хранение и последующее

введение спортсмену собственной крови (аутогемотрансфузия), что широко используется в спортивной практике. На протяжении ряда лет этот метод был практически легальным средством повышения работоспособности спортсменов, и многие спортивные победы и рекорды были результатом применения кровяного допинга.

После введения ВАДА в 1987 г. *запрета на применение кровяного допинга* эта проблема стоит особенно остро, поскольку надежного способа его обнаружения не разработано. Попытки выявить применение кровяного допинга по излишне высокому уровню гемоглобина к успеху не приводят, так как высокий уровень гемоглобина может быть обусловлен генетическими особенностями организма спортсмена, методами тренировки, подготовкой в условиях высокогорья. Ситуация обостряется еще и тем, что в спорте получили распространение официально разрешенные в медицине гормональные средства, способствующие повышению уровня гемоглобина и применяемые при лечении анемии. В частности, в качестве такого средства особое распространение получил эритропоэтин (см. выше).

Химические и физические манипуляции

К данному классу запрещенных методов относятся все возможные действия или приемы, способные изменить целостность и состав пробы, полученной при допинг-контроле.

Генный и клеточный допинг

Генный или клеточный допинг заключается в нетерапевтическом использовании спортсменом генной терапии, генных элементов и/или клеток, ведущих к улучшению спортивных показателей. Методы генного допинга способны напрямую влиять на рост мышц, сокращение содержания жира или выработку специфических гормонов. По этическим соображениям в большинстве стран генная терапия ограничена работой только с соматическими клетками.

Методы генного допинга включают использование:

* нуклеиновых кислот или их аналогов для изменения геномной последовательности и/или изменения экспрессии генов, включая, но не ограничиваясь редактированием, слайсингом и переносом генов; * нормальных или генетически модифицированных клеток.

Определение генного допинга достаточно затруднительно, так как продукты «введенных» генов невозможно отличить от продуктов нативных генов. Наиболее оптимальный подход заключается в прямом изучении образца ткани. Однако данная процедура отбора проб является довольно инвазивной, что запрещено правилами ВАДА.

8.1.7. Субстанции, запрещенные во время соревнований

Стимуляторы

К контролируемым в спорте стимуляторам относятся различные по химической структуре субстанции, в том числе и запрещенные наркотические средства (например, кокаин или экстази). Стимуляторы способствуют формированию повышенной физической и умственной активности, подавлению усталости, повышению работоспособности и настроения. Применение стимуляторов во время соревнований способствует концентрации внимания, подавлению тревоги, а также мобилизуют энергетические запасы организма. Несмотря на простоту определения, стимуляторы активно применяются атлетами в силовых видах спорта и видах спорта на выносливость, а также единоборствах, являясь вторыми по распространенности контролируемыми допинг-субстанциями, выявляемыми антидопинговыми лабораториями в мире.

Наркотики

К данному классу запрещенных в соревновательный период субстанций относятся опиоидные обезболивающие. В первой половине XX в. опиоидные анальгетики в сочетании со стимуляторами активно применялись в велоспорте. Однако на сегодняшний день зарегистрировано малое число положительных проб, содержащих опиоиды из-за простоты их определения, а также из-за наличия на фармацевтическом рынке современных и разрешенных к применению обезболивающих и противовоспалительных средств (например, аспирин, вольтарен и т.д.).

Каннабиноиды как природного (марихуана, гашиш), так и синтетического (APINACA, JWH-018 и т.д.) происхождения запрещены в соревновательный период, с одной стороны, в силу оказываемого седативного и легкого растормаживающего эффекта, а с другой стороны, из-за возможных угроз безопасности спортсмену. Каннабиноиды могут понижать предстартовый мандраж, беспокойство и проявления страха, что дает значительное преимущество атлетам в период соревнований. Злоупотребления каннабиноидами происходят и вне спортивного контекста, поэтому ассоциированные с ними допинговые случаи характерны практически для всех видов спорта.

Глюкокортикоиды

Глюкокортикоиды относятся к группе стероидных гормонов, вырабатываемых корой надпочечников. Они оказывают обезболивающие и противовоспалительные эффекты. Глюкокортикостероиды как эндогенного, так и экзогенного происхождения связываются с глюкокортикостероидными рецепторами, локализованными практически во всех тканях организма, что в результате приводит к глюконеогенезу и распаду белков и жиров в организме. Инъекционные, оральные и ректальные пути введения глюкокортикостероидов находятся под запретом в соревновательном периоде.

Бета-блокаторы

Бета-блокаторы и антагонисты бета-адренорецепторов являются ингибиторами гормонов стресса, адреналина и норадреналина. Они оказывают седативные эффекты, сокращают тремор в мышцах, понижают частоту сердечных сокращений и относятся к запрещенным к употреблению в ряде видов спорта, в которых важна точность и концентрация внимания (например, стрельба, дартс, гольф). Кроме того, бета-блокаторы уменьшают тревожность, в связи с чем они также запрещены к применению в мотоспорте, прыжках на лыжах с трамплина и фристайле.

8.1.8. Терапевтические исключения

В ряде случаев, когда спортсмену по медицинским показаниям необходим прием включенных в Список субстанций или методов, антидопинговые правила предусматривают возможность использования терапевтических исключений. Такое терапевтическое исключение спортсмену выдает аккредитованная медицинская комиссия, состоящая из минимум трех врачей, которые должны подтвердить, что без приема допинговой субстанции здоровье спортсмена значительно ухудшится, а предложенные дозировки не будут оказывать значимого эффекта на спортивные результаты спортсмена.

8.2. Особенности отбора образцов и проведения исследований в допинг-контроле

Как шутят в антидопинговой лаборатории:
«Сейчас победить может каждый,
а ты попробуй анализы сдать».

Анекдот с сайта «Жемчужины мысли»

Отбор проб является одним из самых строго регламентированных и ответственных участков в системе антидопинговых мероприятий. Фактически при отборе проб во избежание осложнений и ошибок при принятии решений и санкциях за употребление допинга должно быть обеспечено однозначное соответствие конкретной пробы и конкретного спортсмена, исключена возможность подмены или фальсификации этой пробы кем бы то ни было, обеспечены адекватные условия хранения и транспортировки образцов в аналитическую лабораторию.

Обязательному антидопинговому контролю подлежат призеры, а также спортсмены, определенные по жребию.

В командных соревнованиях (в зависимости от числа участников) тестированию подлежат 1–2 спортсмена от каждой из команд, занявших первые три места, а также от команды, выбранной по жребию.

Спортсмен может быть протестирован *несколько раз* в течение соревнований.

По решению судейской коллегии допинговому тестированию может быть подвергнут спортсмен, который вызывает подозрение своим поведением, внешним видом, неадекватными реакциями.

Спортсмену, выбранному для допингового контроля, сразу же после окончания соревнований вручается *уведомление*, в котором сообщается о месте и времени взятия у него биопробы.

Спортсмен обязан поставить на уведомлении свою подпись в знак подтверждения того, что он извещен. Спортсмен должен явиться на допинговый пункт с документом, удостоверяющим его личность, не позднее чем через 1 ч после вручения ему уведомления.

Неявка спортсмена на допинговый пункт в указанный срок или отказ от прохождения антидопингового контроля расценивается *как факт применения допинговых препаратов*, и к спортсмену применяются соответствующие санкции.

В допинговом пункте, кроме спортсмена и сопровождающего лица, могут находиться сотрудники допингового контроля, представитель соответствующей спортивной федерации, врач или представитель команды. Присутствие других лиц, в том числе представителей средств массовой информации, на допинговом пункте не разрешается.

Спортсмен не имеет права покидать допинговый пункт до окончания процедуры взятия пробы.

В случае вызова спортсмена на награждение собранная порция биопробы опечатывается в соответствии с требованиями Положения ВАДА. На пункте остается доверенное лицо спортсмена, а сам спортсмен в сопровождении официального представителя допингового пункта идет на награждение.

Отбор биопробы производится в закрытом помещении. Лицам, сопровождающим спортсменов, запрещается находиться в помещении, где производится взятие биопробы.

Устанавливается следующий порядок взятия биопроб: по прибытии спортсмена на допинговый пункт руководитель допингового пункта знакомит спортсмена и сопровождающее его лицо с правилами процедуры отбора биопроб, после чего спортсмен расписывается в протоколе отбора биопроб, что ознакомлен с процедурой. Затем спортсмен выбирает из нескольких предложенных ему упаковок упаковку для отбора биопроб, в которой имеются два флакона и один мочеприемник. В мочеприемник под наблюдением сотрудника допингового пункта должно быть взято не менее 75 мл мочи. Одежда спортсмена не должна препятствовать наблюдению за мочеиспусканием. Далее спортсмен должен вернуться в кабинет врача с емкостью, наполненной мочой.

Спортсмен сам разливает из мочеприемника равное количество мочи в два флакона и плотно их закрывает. В мочеприемнике по остаткам мочи измеряется температура, плотность и pH пробы (pH мочи не должен быть менее 5,0 и более 7,0, моча должна иметь удельный вес не менее 1,010 г/см^3^, температура пробы не должна быть ниже 32 °С) и заносится в протокол. Руководитель допингового пункта убеждается в том, что *оба флакона* (*пробы А и Б*) плотно закрыты, затем герметично закрывает их.

Руководитель допингового пункта должен предоставить спортсмену и сопровождающему его лицу возможность убедиться в том, что флаконы опечатаны и промаркированы правильно. Далее он записывает в протокол допинг-контроля кодовый номер и перечень медикаментов, принятых спортсменом за последние 3 дня, дает возможность спортсмену и сопровождающему его лицу сверить кодовый номер флаконов с кодовым номером, записанным в протоколе.

Опечатанные флаконы в контейнере для транспортировки биопроб отправляются *спецтранспортом* в лабораторию, проводящую анализ, и сдаются под расписку. Одновременно туда же отправляются транспортные протоколы, содержащие коды флаконов и сведения о принятых лекарствах (если это имело место).

Анализ, как правило, должен быть проведен в течение 72 ч после получения проб лабораторией. В отдельных случаях в связи с ее загруженностью этот срок может быть увеличен до 5 рабочих дней с момента доставки проб в лабораторию.

В случае положительного результата пробы А лаборатория немедленно извещает спортсмена:

* о положительном результате анализа; * праве спортсмена на немедленный запрос на проведение анализа пробы Б (отсутствие запроса в течение 7 дней после извещения спортсмена является юридическим основанием считать результат положительным); * праве спортсмена и/или его представителя присутствовать при вскрытии и анализе

пробы Б, если на этот анализ был подан запрос; * праве спортсмена подать запрос на предоставление ему копий документации по анализам проб А и Б, предусмотренной в Международных стандартах для лабораторных анализов.

В зависимости от полученного результата при исследовании пробы А осуществляются дальнейшие мероприятия.

При положительном результате в пробе А спортсмен временно отстраняется от участия в соревнованиях до вынесения решения о санкциях. Распространение информации о результатах анализа пробы А не допускается.

Процедура проведения *контрольного анализа пробы Б* (где, в какие сроки, кто и в чьем присутствии, а также интерпретация полученных результатов и другие действия) строго регламентирована ВАДА.

Контрольное исследование проводится *не позднее 7 дней* с момента получения запроса о проведении пробы Б от спортсмена. В присутствии комиссии из трех человек производится осмотр и вскрытие пробы Б, о чем составляется соответствующий акт. Отсутствие спортсмена и представителя спортивной организации не является препятствием для проведения контрольного исследования.

Если результат пробы Б не подтверждает результат анализа пробы А, то результат анализа считается отрицательным.

Результат контрольного исследования *пробы Б окончателен* и пересмотру не подлежит.

Только получение *положительного результата* в пробе Б является основанием для объявления спортсмена лицом, употреблявшим *запрещенные допинговые средства*.

Схема проведения допинг-контроля образца мочи представлена на рис. 8-2.

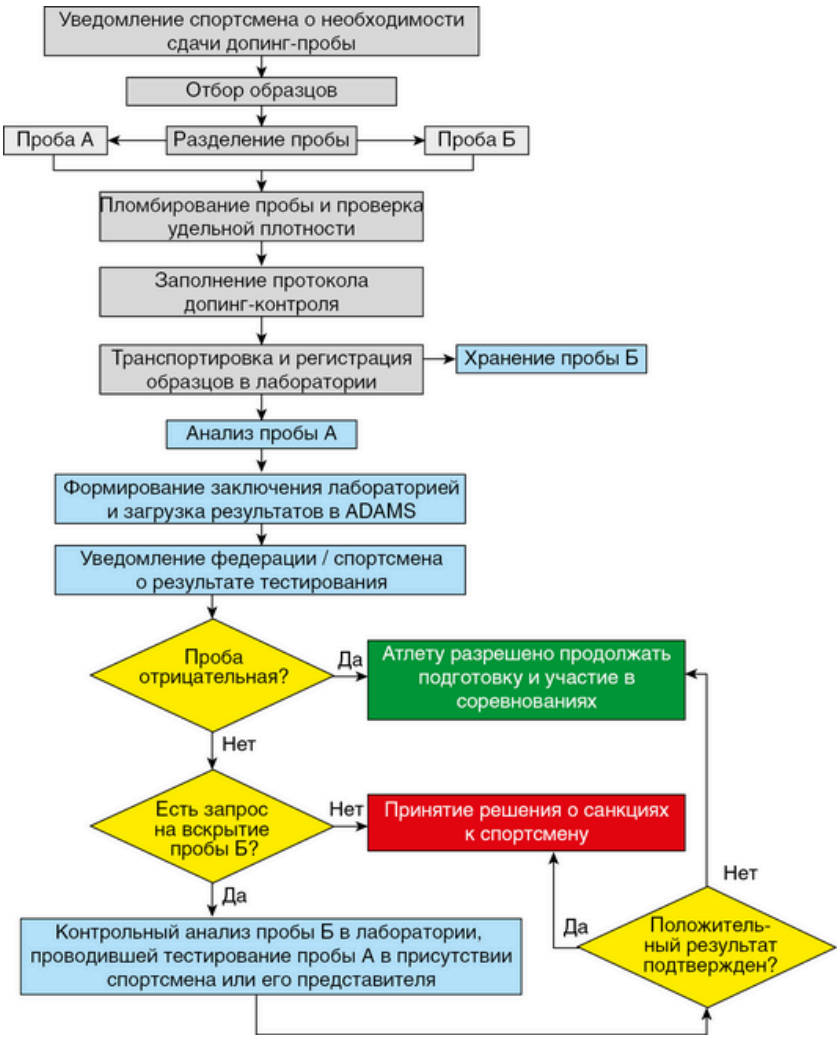


Рис. 8-2. Схема проведения допинг-контроля образца мочи

Нарушением антидопинговых правил являются:

* присутствие запрещенных субстанций, или их метаболитов, или маркеров в пробе, взятой у спортсмена; * использование или попытка использования запрещенной субстанции; * отказ или непредоставление проб после того, как спортсмен был проинформирован о необходимости их сдачи, если не будут документально подтверждены уважительные причины непредоставления пробы или уклонения от сдачи проб; * нарушение существующих требований относительно доступности спортсмена для взятия у него проб во время внесоревновательного периода, включая непредоставление информации о местонахождении спортсмена и пропуски очередных тестирований; * фальсификация или попытка фальсификации в любой сфере допинг-контроля; * обладание запрещенными субстанциями; * распространение любой запрещенной субстанции; * назначение или попытка назначения спортсмену любой запрещенной субстанции или содействие, подстрекательство, помощь, потворство, укрывательство и любой другой вид соучастия в нарушении антидопинговых правил или в попытке нарушения.

Пробы допинг-контроля на международных соревнованиях должны анализироваться *только в лабораториях, аккредитованных ВАДА*. Выбор конкретной лаборатории, аккредитованной ВАДА, для анализа взятых проб определяется исключительно антидопинговой организацией, ответственной за результаты анализа. При этом указанные пробы должны анализироваться исключительно на предмет обнаружения в них запрещенных субстанций или использования запрещенных методов, указанных в Списке, а также дополнительно указанных ВАДА субстанций.

Особые требования предъявляются ВАДА к аналитическим лабораториям и качеству проводимых ими исследований. Для получения аккредитации ВАДА лаборатории должны удовлетворять жестким требованиям и пройти несколько ступеней тестирования и проверки на техническую компетентность и независимость.

В первую очередь кандидаты на получение аккредитации должны в своей работе неукоснительно следовать требованиям международных организаций по стандартизации и качеству проведения исследований (ISO, OECD, EU), основываясь на положениях GLP (см. гл. 4). Для российских условий данное положение основано на получении регистрации в Государственном реестре Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии на соответствие требованиям Системы аккредитации аналитических лабораторий (центров), а также требованиям ГОСТ Р ИЗО/МЭК 17025 на техническую компетентность и независимость.

Дальнейшие шаги *для получения аккредитации ВАДА* основываются на подготовке пакета документов, в которых прежде всего раскрывается работа лаборатории:

* наличие оборудования; * наличие стандартов исследуемых веществ; * наличие методического обеспечения проведения исследований; * квалификация персонала; * вопросы финансирования; * объемы планируемых работ.

Эти документы рассматриваются ВАДА, после чего наступает *этап преаккредитации.* В течение этого этапа лаборатория получает три серии проб мочи в течение 6–12 мес, которые она должна протестировать на присутствие запрещенных веществ или их метаболитов.

При успешном прохождении данного этапа наступает этап *собственно аккредитации*. В этот период лаборатории дается задание провести исследование 10 подготовленных ВАДА проб, которые она должна проанализировать за 3 дня. При этом за ходом анализа наблюдает комиссия экспертов ВАДА. Лишь получив правильные ответы по всем 10 пробам, а также положительное заключение комиссии, лаборатория может рассчитывать на получение аккредитации.

Получившие аккредитацию ВАДА лаборатории имеют право проводить исследования проб, изъятых в ходе международных соревнований самого высокого уровня. Для поддержания работоспособности своих лабораторий ВАДА осуществляет комплекс мер, в который входит *реаккредитация*, заключающаяся в предоставлении лабораториям раз в квартал обычно пяти контрольных проб, которые они должны проанализировать в ходе обычных рутинных процедур и подготовить расширенный отчет по каждой из них. Данный отчет рассматривается компетентной комиссией, и в случае неправильной идентификации или ошибки в количественном определении хотя бы одного из веществ принимается решение *о лишении данной лаборатории аккредитации* (обычно) или снижении ее статуса.

Для проверки квалификации *отдельных сотрудников*, кроме проб по реаккредитации, время от времени лаборатория получает образцы так называемого *профессионального теста,* который заключается в исследовании образцов на присутствие отдельных групп контролируемых веществ или даже отдельных веществ и их метаболитов.

Высокий уровень квалификации сотрудников лабораторий поддерживается на ежегодных встречах, на которых обсуждаются вопросы развития аналитических методов определения допингов, последние научные разработки и достижения в этой области.

Всего в 2022 г. ВАДА аккредитованы 29 лабораторий и еще несколько проходят аккредитацию.

8.3. Методы исследования и интерпретация полученных результатов

Будем собирать факты,
чтобы появились идеи.

Луи Пастер (1822–1895), выдающийся
французский химик и врач, основоположник
микробиологии, создатель научных основ
вакцинации и стереохимии,
технологии пастеризации

При проведении допинг-контроля аккредитованными ВАДА лабораториями используется комплекс химических, биологических и физико-химических методов. Огромное значение придается доказательству *химической структуры* обнаруженного вещества и/или продуктов его метаболизма. Перечень запрещенных веществ и методов показывает, что тестирование одного спортсмена должно включать несколько процедур, каждая из которых призвана выявлять присутствие отдельных групп допингов. Соответственно, для каждого анализа должна отбираться отдельная аликвота исследуемого образца мочи. В зависимости от поставленной задачи количество аликвот может доходить до восьми и более, при этом каждая из них подразумевает проведение исследования по собственной схеме.

Допинговый анализ предусматривает проведение предварительного скринингового исследования допинговых субстанций. Современные высокоэффективные жидкостные хроматографы в сочетании с тандемными масс-спектрометрами дают возможность проведения эффективного и быстрого анализа различных классов запрещенных субстанций (зачастую включающих анализ более 100 соединений) в рамках одного «вкола».

8.3.1. Скрининговая методика определения допинговых средств

Ниже приведены параметры методики скринингового метода СВЭЖХ-МС/МС по определению допинговых средств в моче человека. В качестве примера продемонстрирован анализ вероятно положительного образца, в котором установлено присутствие амфетамина.

При подготовке образцов мочи для скринингового анализа используется метод dilute-and-shoot («разбавил и вколол»). К 100 мкл образца мочи добавляют 150 мкл смеси ацетонитрил и воды в соотношении 7:1 (л:л). Далее раствор встряхивают на шейкере и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 5 мин. Далее к 40 мкл супернатанта добавляют 60 мкл воды и смесь переносят в виалы для анализа СВЭЖХ-МС/МС.

При проведении инструментального анализа хроматографическое разделение выполняют на колонке С18 (2,2 мкм, 100´2,1 мм). Скорость потока подвижной фазы — 0,5 мл/мин; температура колонки – 40 °С; объем вводимой пробы — 10 мкл; подвижная фаза А — 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде с 2 мМ формиатом аммония; подвижная фаза Б — 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле с 2 мМ формиатом аммония. Градиентное элюирование выполняется по следующей программе: 0 мин — 1%Б; 1 мин — 1%Б; 8 мин — 99%Б; 9 мин — 99%Б; 9,1 мин — 1%Б; 10,99 мин — 1%Б, 11 мин — 1%Б. Масс-спектрометрическое детектирование проводится с использованием следующих параметров: напряжение на конусе — 25 В; скорость потока газа десольватации — 1000 л/ч; температура источника – 148 °С; температура газа десольватации — 600 °С;; напряжение в капилляре — 2000 В.

На рис. 8-3 представлен пример определения в моче одного из самых распространенных стимуляторов — амфетамина. Помимо хроматограмм субстанций, выявленных в исследованном образце, на рис. 8-3 приводится хроматограмма образца контроля качества, содержавшего амфетамин в концентрации 5 нг/мл, а также холостого образца сертифицированной мочи, не включавшей допинговых средств. Для каждого образца приводятся хроматограммы двух характерных переходов амфетамина.

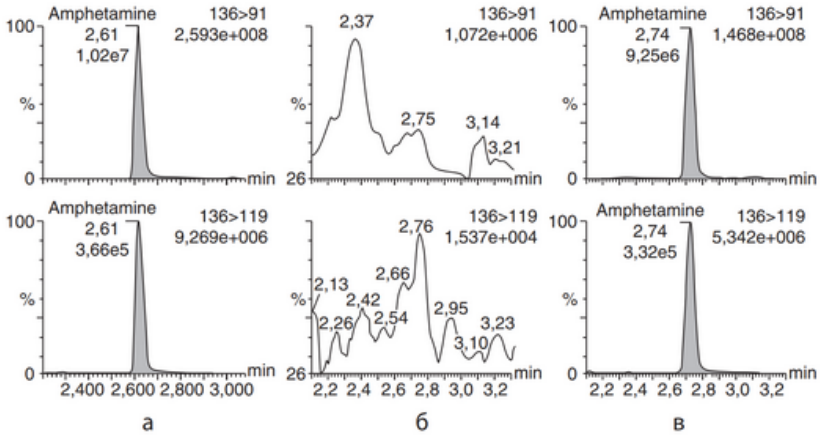


Рис 8-3. А — хроматограммы образца контроля качества, содержащего амфетамин в концентрации 5 нг/мл; **Б** — хроматограммы холостого образца (отрицательный контроль качества); **В** — хроматограммы вероятно положительной пробы на амфетамин, выявленной при скрининговом анализе

Для подтверждающего анализа проводят повторную пробоподготовку и инструментальный анализ новой аликвоты мочи, а также отрицательного и положительного контролей качества. Необходимо, чтобы концентрация положительного контроля качества соответствовала концентрации в подтверждаемом образце. Пробоподготовку выполняют в соответствии с методикой, представленной выше. В случае низкой концентрации искомых соединений в вероятно положительном образце необходимо проводить концентрирование образца методом ЖЖЭ.

Многие допинговые субстанции подвержены быстрому метаболизму в организме человека, что в итоге заметно сужает временное окно их детектирования. Поэтому для улучшения качества допингового контроля необходимо не только совершенствовать методики их определения, но также и изучать метаболизм, необходимый для выявления наиболее стабильных и долгоживущих метаболитов. Так, один из новых синтетических каннабимиметиков 5F-Апинак подвержен быстрому метаболизму. В результате его распада в моче крыс детектируется 15 продуктов распада (рис. 8-4). Наиболее стабильным производным 5F-Апинак является метаболит, образованный в результате гидролиза сложноэфирной связи (М7), а также метаболиты М4 и М13. Эти метаболиты могут использоваться в качестве маркеров приема 5F-Апинак.

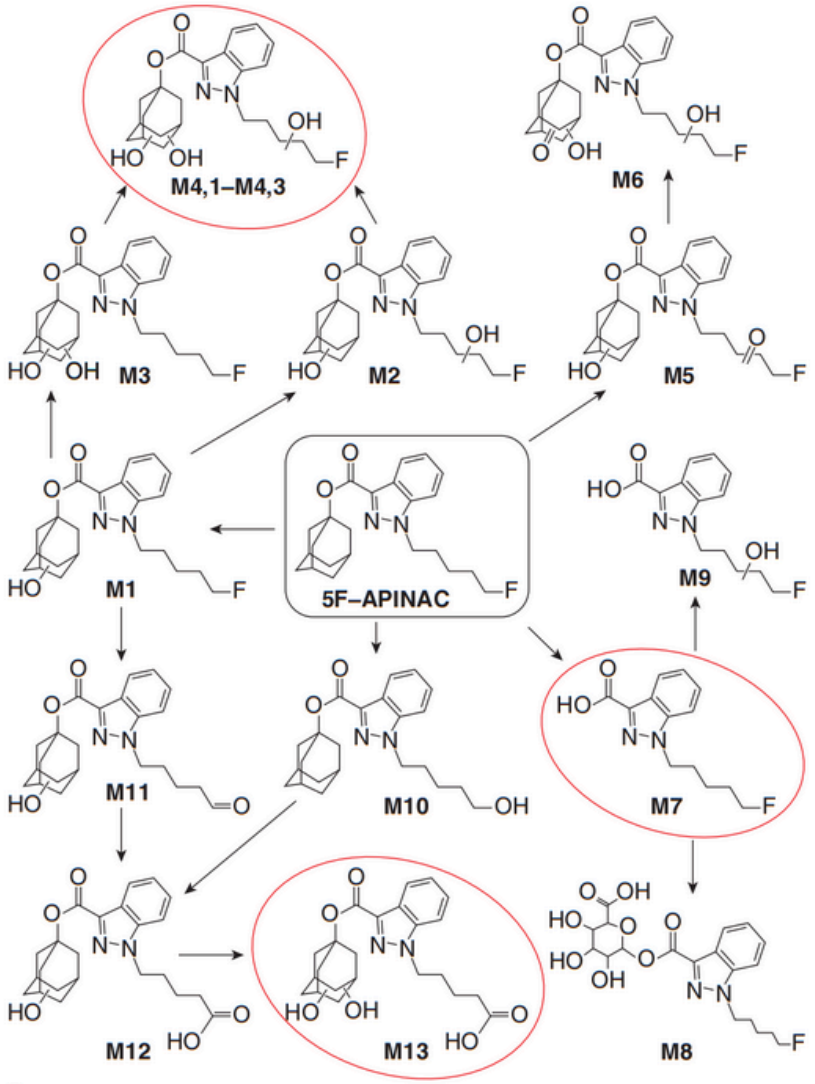
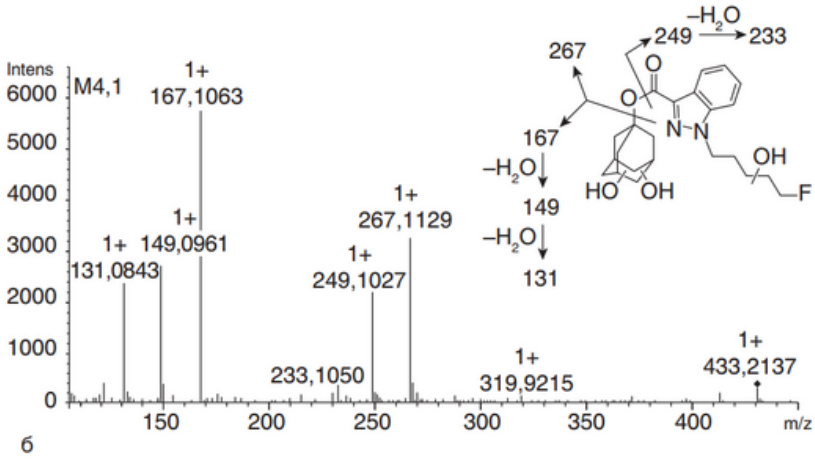


Рис 8-4. *а* — предполагаемая схема метаболизма 5F-Апинак. Значимые метаболиты выделены красным



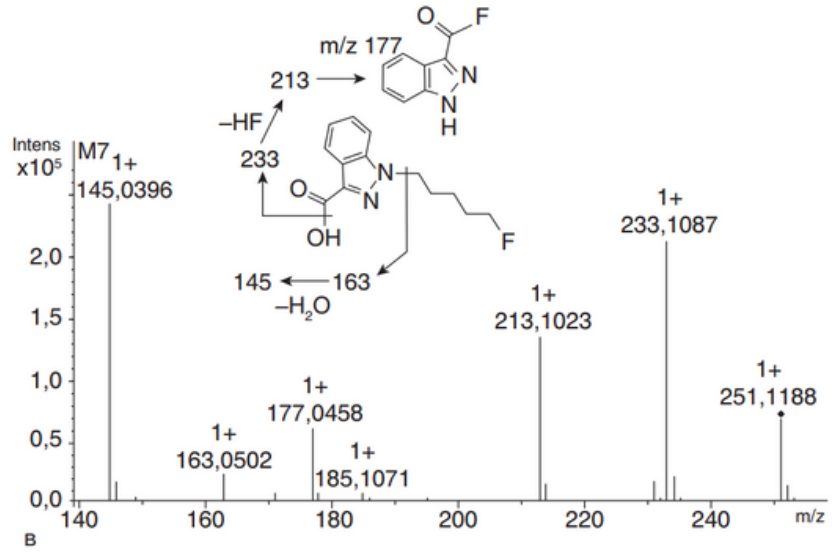


Рис 8-4. *Продолжение*. *б* — спектр высокого разрешения метаболита М4, образованного в результате тригидроксилирования; *в* — спектр высокого разрешения основного метаболита М7, образованного в результате гидролиза сложноэфирной связи

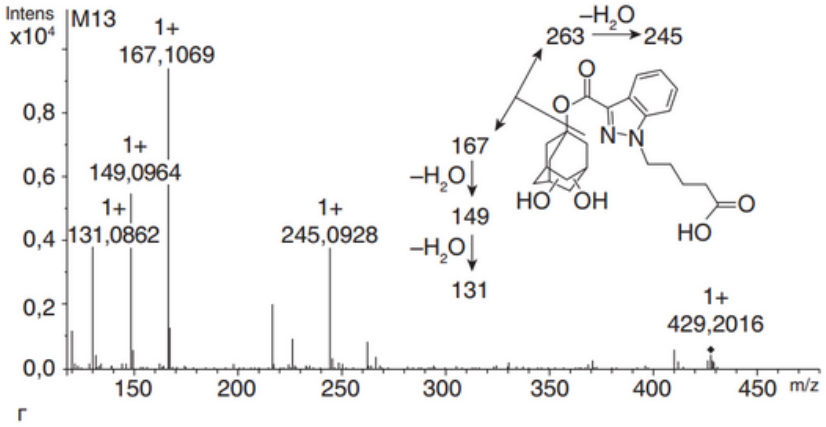


Рис 8-4. *Окончание*. *г* — спектр высокого разрешения метаболита М13, образованного в результате окислительного дефторирования и дигидроксилирования.

8.3.2. Исследование на присутствие анаболических стероидов

Было бы куда лучше, если бы
людей учили не тому,
что думать, а тому, как думать.

Георг Кристоф Лихтенберг (1742–1799),
немецкий физик и астроном, известный
публицист, почетный член Петербургской АН,
ввел обозначение электрических зарядов как «+» и «–»

Наиболее сложным в допинг-контроле является исследование мочи на присутствие анаболических стероидов. Это обусловлено их низкой концентрацией, большим числом метаболитов и субстанций эндогенного характера, близких по химической структуре. На рис. 8-5, *а* приведены химические структуры популярного андрогенного анаболического стероида метандиенона и его три наиболее долгоживущих метаболита.

 ISBN9785970482353

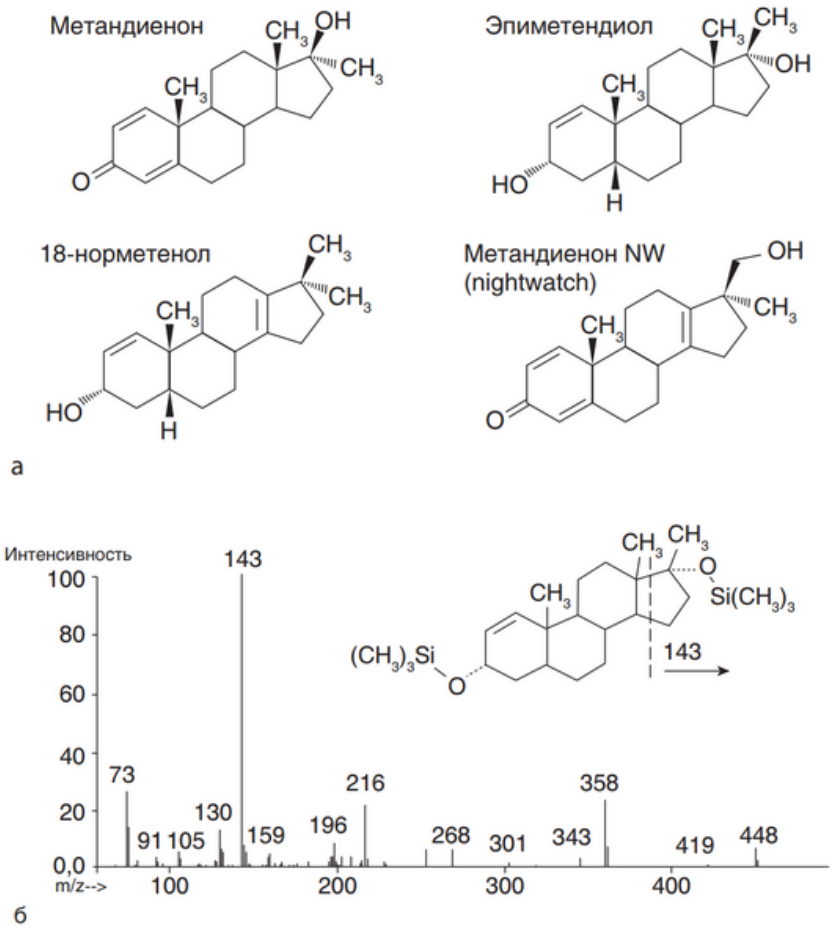


Рис. 8-5. *а* — химические структуры метандиненона и его основных метаболитов; *б* — масс-спектр и схема фрагментации триметилсилильного производного эпиметендиола (17β-метил-5β-андрост-1-ен-3α, 17α-диол-бис-ТМС)

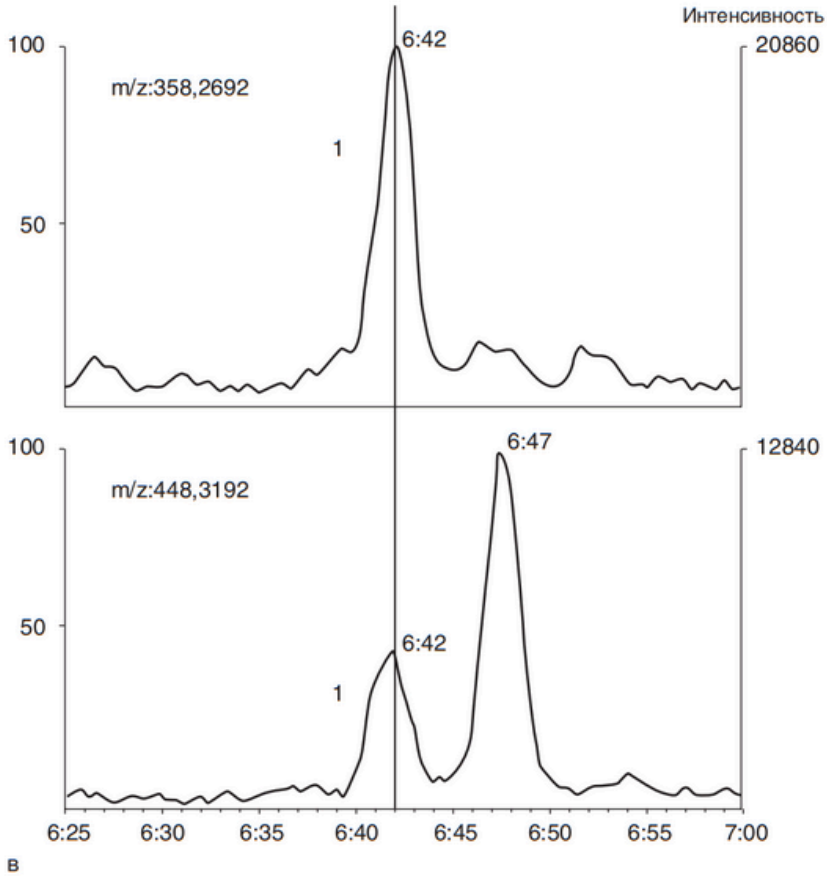


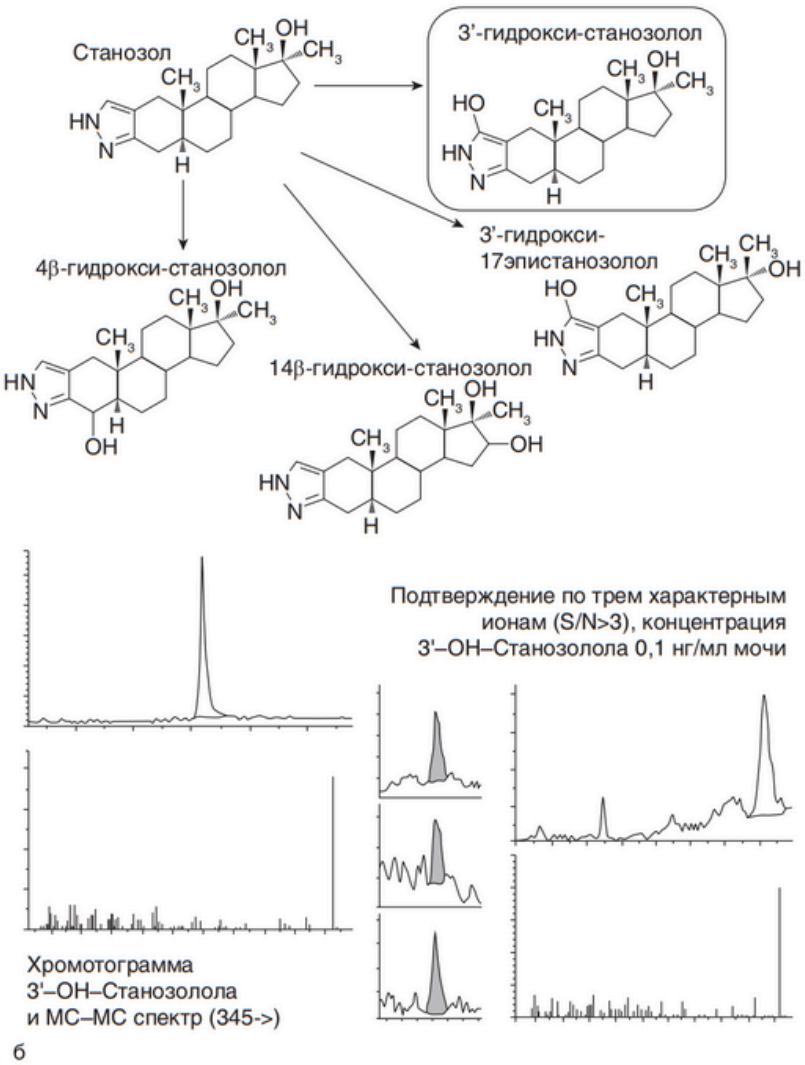
Рис. 8-5. *Окончание. в* — масс-фрагментограммы высокого разрешения 17β-метил-5β-андрост-1-ен-3α, 17α-диол-бис-ТМС — триметилсилильного производного метаболита метандиенона, выделенного из мочи атлета

Идентификацию андрогенных анаболических стероидов в моче спортсменов обычно проводят методами газовой и жидкостной МС. Предварительную пробоподготовку выполняют с применением ферментативного гидролиза бета-глюкуронидазой и последующей ЖЖЭ диметиловым эфиром. В случае выполнения анализа ГХ-МС/МС супернатант после ЖЖЭ дериватизируют N-метил-N-триметилсилил-трифторацетамидом в присутствии иодида аммония и дитиотриола.

В результате дериватизации образуются триметилсилильные производные андрогенных анаболических стероидов и их метаболитов. На рис. 8-5, *б* приведен МС метаболита метандиенона, эпиметендиола, полученного с использованием масс-спектрометра низкого разрешения. Как видно, решение вопроса об употреблении спортсменом метандиенона основывается на обнаружении в его моче характерных метаболитов в виде их силильных производных. Однако на хроматограмме в месте выхода основного метаболита метандиенона появляется еще один хроматографический пик, соответствующий эндогенному веществу, которое к тому же имеет близкий по внешнему виду МС низкого разрешения. Разделить эти два вещества хроматографически достаточно трудно. Однако «не бывает безвыходных ситуаций, бывают ситуации, выход из которых тебя не устраивает. Чтобы чего-то добиться, нужно идти до конца» (Масаси Кисимото, род. 1974, японский художник и писатель). Выход был найден: использование МС *высокого разрешения*.

Так, на рис. 8-5, *в* представлены хроматограммы двух характеристических ионов исследуемого и эндогенного вещества, полученные на приборе высокого разрешения. Как видно, от влияния соэкстрактивного вещества удалось избавиться и однозначно идентифицировать метаболит метандиенона в моче атлета.

На рис. 8-6 приведена схема биотрансформации и результаты исследования методом ВЭЖХ-МС/МС экстракта мочи атлета, принимавшего станозолол, который в настоящее время является одним из самых проблематичных для анализа анаболических стероидов. Чувствительность определения 3´-гидроксистанозолола — метаболита станозолола в моче составляет 0,1 нг/мл.



б

Рис. 8-6. *а* – схема биотрансформации станозолола; *б* – результаты определения 3'-гидроксистанозолола в моче атлета методом ВЭЖХ-МС/МС

Глава 9. Экотоксиканты

Много в пространстве невидимых форм и неслышимых звуков,
Много чудесных в нем есть сочетаний и слова, и света,
Но передаст их лишь тот, кто умеет и видеть, и слышать,
Кто уловил лишь рисунка черту, лишь созвучье, лишь слово,
Целое с ним вовлекает созданье в наш мир удивленный…

Алексей Константинович Толстой (1617–1875),
выдающийся русский писатель, поэт,
драматург, переводчик, сатирик из рода Толстых,
член-корреспондент Петербургской АН

Степень риска для здоровья человека при использовании различных химических веществ, соотношение между их безопасностью и эффективностью постоянно подвергаются переоценке. Это делается для выявления взаимосвязи между применяемыми агентами и их влиянием на патологию развития плода, рост числа онкозаболеваний, эндокринных или других нарушений организма.

На современном этапе развития науки и техники неизбежно использование как на производстве, так и в быту широкого круга опасных для человека и окружающей среды химикатов. Разнообразие и количество используемых химических соединений зависят от большого числа факторов, среди которых немаловажное значение имеют экономический статус развития региона, наличие или отсутствие в нем природных или альтернативных источников сырья. Загрязнение среды обитания стало глобальным, стабильным и постоянно действующим фактором, а для отдельных регионов прослеживается устойчивая совокупность загрязнителей, определяющих «токсическую» ситуацию в них.

Приоритетными загрязнителями большинства территорий являются органические вещества (полициклические ароматические углеводороды, фенол, формальдегид и др.), тяжелые металлы, оксиды азота и углерода, диоксид серы.

Для источников питьевого водоснабжения приоритетными загрязнителями являются токсичные вещества, состав которых во многом определяется региональными особенностями развития производства. Значительную опасность для здоровья населения представляет загрязнение почвы соединениями металлов.

Согласно данным *международного регистра*, до 6 млн токсичных веществ используется в промышленности, сельском хозяйстве и для бытовых целей. Около 60 000 из них производят в больших количествах, в том числе более 500, относящихся к группе *сильно действующих ядовитых веществ (СДЯВ).* СДЯВ — высокотоксичные химические вещества, применяемые в промышленности и сельском хозяйстве и способные вызвать массовые поражения людей, животных и загрязнять окружающую среду при сбросе на поверхность земли или выбросе в атмосферу.

Очень опасны группы *СОЗ*, которые воздействуют на среду обитания на чрезвычайно низком уровне (нижний предел обнаружения 10^–8^–10^–13^%). Многие из них известны давно и широко использовались в промышленности и сельском хозяйстве большинства стран.

Международное агентство по регистрации токсичных субстанций и заболеваний составило *перечень 275 ранжированных по степени опасности химических соединений*. К приоритетным загрязнителям относены мышьяк, свинец, ртуть, винилхлорид, бензол, ПХБ, кадмий, бенз(а)пирен, бензо(b)флуорантен, полициклические ароматические соединения, оксиды азота и углерода, диоксид серы, фенол, формальдегид и др.

Обязательная регистрация всех вновь поступающих в обращение химических веществ отечественного и зарубежного производства в *Российском регистре потенциально опасных химических и биологических веществ* показывает, что их число к 2022 г. составило более 2500 наименований.

В настоящее время в РФ с учетом разработанных критериев отбора веществ, вызывающих наибольшие опасения специалистов, ведутся работы по созданию националного списка высокоопасных химических веществ, соответствующих использованию в конкретных отраслях промышленности [Токсикологический вестник. 2022. № 30(2). С. 68–78].

Опубликовано много работ о чувствительности человека и животных к сверхмалым — пико- (×10^–12^ моль) и фемто- (×10^–15^ моль) — дозам токсикантов. Согласно современным представлениям все биологически активные вещества, в том числе и экотоксиканты, вводимые в организм в малых дозах, повторяют свойственное им действие в больших дозах, но растянутое по времени. Полученные новые данные, по-видимому, приведут к пересмотру безопасных и предельно допустимых уровней воздействия токсикантов на живой организм.

Часто употребляемым термином *синдром химической чувствительности* (СХЧ, чаще — ХЧ) обозначают последствия для человека экспозиции химических веществ из окружающей среды. Генетические особенности индивидуума лежат в основе развития ХЧ. Индивидуальная ХЧ — одна из причин повышенной интоксикации, заболеваемости раком, болезней дыхательных путей, возникновения некоторых неврологических и психических расстройств, а также синдрома хронической усталости не только у работников химических производств.

ХЧ проявляется как разновидность скрытой («крипто») токсичности и *развивается в две стадии*:

* снижение толерантности после острой или хронической экспозиции загрязнителями окружающей среды; * проявление симптомов заболевания при экспозиции чрезвычайно низкими концентрациями химических веществ.

Синдром ХЧ во многом обусловлен генетически детерминированной индивидуальной ферментной активностью каждого человека, т. е. наследственным полиморфизмом генов.

Практическим следствием признания действия сверхмалых доз и возникновения синдрома ХЧ является снижение минимальных уровней риска интоксикации.

Например, по оценке ВОЗ, *каждый избыточный микрограмм бензола в воздушной среде сверх 6 мкг / м^3^ эквивалентен риску возникновения шести случаев заболевания лейкемией на миллион жителей*.

Для оценки последствий воздействия канцерогенных веществ введена «единица избыточного риска» (Unit Risk Excess), позволяющая оценивать риск поражения организма при определенном уровне воздействия на него токсичных соединений.

Прежде чем какое-либо вещество будет применяться в промышленности или сельском хозяйстве, обычно устанавливают:

* нет ли к нему уникальной чувствительности ключевых видов животных биогеоценоза из разных классов; * взаимодействуют ли живые организмы (от микроорганизмов до человека) с неживыми (абиотическими) компонентами окружающей среды, подвергнутыми обработке, что иногда может привести к усилению токсических эффектов; * будет ли наблюдаться потенцирование токсического воздействия смеси химических веществ; * воздействует ли токсичное вещество только на индивидуальные организмы или на выживание экосистемы в целом.

9.1. Экотоксичность и экотоксиканты

Все видеть, все понять,
Все знать, все пережить,
Все формы, все цвета вобрать в себя глазами,
Пройти по всей земле горящими ступнями,
Все воспринять и
Снова воплотить.

Максимилиан Александрович Волошин (1877–1932),
известный русский и советский поэт-символист,
переводчик, художник-пейзажист, критик

Впервые термин «экотоксикология» был использован в конце 60-х годов XX в. Экотоксикология — междисциплинарная область науки об окружающей среде. Ее основу составляют химия (в самом широком понимании), экология, токсикология, физиология, популяционная генетика, биология и молекулярная медицина.

Экотоксикология — «наука, изучающая реакции различных экосистем на химический стресс путем их моделирования и биомониторинга. Экотоксикология исследует также правовые и научные аспекты принятия решений по экологическим проблемам» (Словарь обществоведческих терминов, 1999).

Основной закон экотоксикологии — закон лимитирующих факторов: фактор, находящийся в недостатке или избытке, отрицательно влияет на организмы даже в случае оптимальных сочетаний других факторов (рис. 9-1).

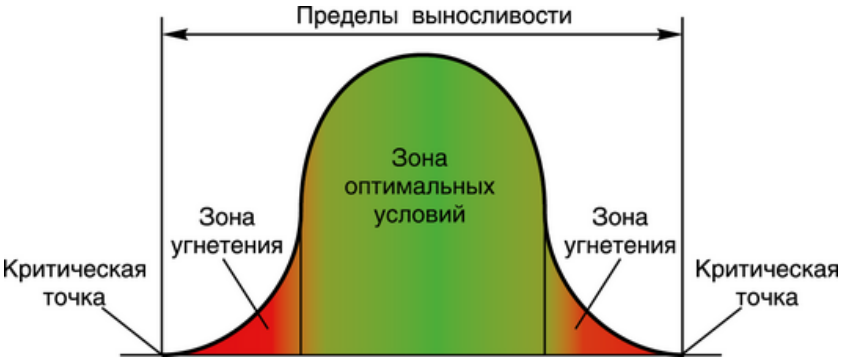


Рис. 9-1. Графическое изображение закона лимитирующих факторов

Объектами изучения экотоксикологии являются вещества, обладающие биодоступностью, что обусловливает возможное нарушение обмена веществ, а также физико-химической структуры клеток и тканей, в результате чего могут возникнуть патологические изменения.

Эти соединения находятся в газообразном и жидком состоянии или адсорбированы на частицах почвы и различных поверхностях, а также в виде мелкодисперсной пыли твердых веществ (размер частиц менее 50 мкм). Значительной биодоступностью обладают многие токсиканты, поступающие в организм с пищей.

Химические вещества, накапливающиеся в окружающей среде в несвойственных ей количествах, относят к *экополлютантам* (загрязнителям), одновременно возможно избыточное накопление как одного, так и многих экополлютантов (табл. 9-1).

Таблица 9-1. Основные экополлютанты

Загрязнители воздуха	**Загрязнители воды и почвы**
	Металлы (свинец, кадмий, ртуть и др.).
	Мышьяк.
	Хлорорганические пестициды (4,4-ДДТ, алдрин, диэлдрин,
	или дильдрин, хлордан).
	Нитраты.
Газы:	Фосфаты.
* оксиды серы; * оксиды азота; * оксиды	Нефть и нефтепродукты.
углерода; * озон; * хлор; * углеводороды; *	Органические растворители (толуол, бензол, тетрахлорэтилен
фреоны.	и др.).
Пылевые частицы:	Фенолы.
* асбест; * угольная пыль; * оксид кремния; *	Низкомолекулярные галогенированные углеводороды (хлороформ,
металлы	бромдихлорметан, бромоформ, тетрахлорметан, дихлорэтан и др.)
	Полициклические ароматические углеводороды.
	ПХБ.
	Диоксины.
	Дибензофураны.
	Сильные минеральные кислоты

Экотоксикант — это экополлютант, накопившийся в среде в количестве, достаточном для инициации токсического процесса в биогеоценозе (на любом уровне организации живой материи).

Задачи экотоксикологии заключаются в установлении возможных путей аккумуляции, биотрансформации, множественных связей экотоксикантов с теми или иными видами биот и предсказании экотоксикологических последствий. Особенно важны количественные характеристики устойчивости токсикантов и продуктов их превращений в природных условиях, которые получают либо в ходе мониторинга — отслеживания изменения концентраций отдельных химических соединений путем систематического анализа представительных проб воздуха, воды и почвы, либо в результате лабораторного моделирования.

Одна из практических задач экотоксикологии — *определение количества экополлютанта, при котором его уже считают экотоксикантом.*

Примерами перехода экополлютантов в разряд экотоксикантов могут служить превращения веществ, а также значительное увеличение их концентрации при пожаре. Выброс в окружающую среду токсичных веществ, образующихся в результате термодеструкции различных синтетических материалов, вызывает накопление диоксинов, цианидов, фосфорорганических веществ, оксида углерода(II) и других соединений на прилегающих к очагам поражения территориях. Экологическая опасность многих групп токсикантов усиливается вследствие высокой устойчивости их к воздействию физико-химических факторов окружающей среды и медленной биодеструкции.

Элементом экотоксикологической экспертизы поллютантов является идентификация их *источников.* Решить эту задачу далеко не просто, так как порой вещество поступает в среду в ничтожных количествах, иногда в виде примесей к нетоксичным субстанциям. Образование экополлютанта в окружающей среде возможно в результате абиотических или биотических трансформаций других веществ.

Многочисленные *абиотические* (происходящие без участия живых организмов) и *биотические* (происходящие с участием живых организмов) процессы в окружающей среде направлены на элиминацию экополлютантов. Ряд ксенобиотиков, попав в воздух, почву, воду, приносят минимальный вред экосистемам, поскольку время их воздействия ничтожно мало. Вещества, оказывающиеся резистентными к процессам разрушения и вследствие этого длительно находящиеся в окружающей среде, как правило, являются потенциально опасными экотоксикантами (табл. 9-2).

Таблица 9-2. Период полураспада некоторых поллютантов в окружающей среде

Поллютант	Период полураспада	Среда
ДДТ	12 лет	Почва
2,3,7,8-ТХДД*	9 лет	Почва
Атразин	25 мес	Вода (pH 7,0)
Бензоперилен	14 мес	Почва
Фенантрен	138 дней	Почва
Карбофуран	45 дней	Вода (pH 7,0)
Фосфорилтиохолины	21 день	Почва (15 °C)
Иприт	7 дней	Почва (15 °C)
Зарин	4 ч	Почва (15 °C)

* 2,3,7,8-ТХДД — 2,3,7,8-тетрахлордибензо-р-диоксин.

К числу веществ, *длительно сохраняющихся в окружающей среде*, относятся соединения таких металлов, как свинец, медь, цинк, никель, кадмий, кобальт, сурьма, ртуть, хром, а также мышьяк, полициклические полигалогенированные углеводороды (полихлорированные дибензодиоксины и дибензофураны, ПХБ и т.д.), некоторые хлорорганические пестициды (ДДТ, гексахлоран, алдрин, линдан и т.д.) и др.

Установлено, что по мере движения химических соединений по пищевой цепи от продуцентов (лат. *producens* — производящий, создающий; организмы, способные к фото- или хемосинтезу и являющиеся в пищевой цепи первым звеном или источником образования органических веществ из неорганических) до консументов (лат. *consumo* — потребляю; организмы, являющиеся в пищевой цепи потребителями органического вещества) *количество экотоксиканта* вследствие медленной биотрансформации и неполной экскреции во внешнюю среду *накапливается в возрастающих концентрациях.*

Процесс увеличения концентрации токсиканта в различных организмах при переходе от низших трофических уровней данной экосистемы к высшим называют *экологической магнификацией*. Например, в планктоне содержание диметилртути составляет примерно 0,01 мкг / г, в мышечной ткани хищных рыб достигает 1,5 мкг/г, а у птиц-рыболовов — 3–14 мкг / г. При исследовании одной из экосистем озера Мичиган было обнаружено следующее накопление ДДТ в пищевых цепях: в донном иле озера — 0,014 мг / кг, у ракообразных, питающихся на дне, — 0,41 мг / кг, у различных рыб — 3–6 мг / кг, в жировой ткани чаек, питающихся этой рыбой, — свыше 200 мг / кг.

Экотоксичность — способность экотоксиканта вызывать неблагоприятные эффекты в соответствующей экосистеме, проявляющиеся на уровне (по С. А. Куценко):

* организма (аутэкотоксические) снижением резистентности к другим действующим факторам среды, ростом заболеваемости, в том числе раком, нарушениями репродуктивных функций и даже гибелью организма; * популяции (демэкотоксические) гибелью популяции, ростом заболеваемости, смертности, уменьшением рождаемости, увеличением числа врожденных дефектов развития, нарушением демографических характеристик (соотношение возраста, пола и т.д.), изменением средней продолжительности жизни; * биогеоценоза (синэкотоксические) изменением популяционного спектра ценоза вплоть до исчезновения отдельных видов и появления новых, не свойственных данному биоценозу, нарушением межвидовых взаимоотношений.

При оценке экотоксичности лишь *одного вещества* в отношении представителей *только одного вида* живых существ в полной мере могут быть использованы качественные и количественные характеристики, принятые в классической токсикологии, — дозы и концентрации токсиканта, проявляющие острую, подострую, хроническую токсичность, мутагенный, канцерогенный и иные эффекты.

В табл. 9-3 приведены ПДК (уровни) некоторых токсичных веществ в различных объектах.

Таблица 9-3. Предельно допустимые концентрации (уровни) некоторых токсичных веществ в различных объектах

Вещество	**Вода, мг / л**	**Воздух, мг / м^3^**	**Почва, мг / кг**	
			Подвижная форма	**Валовая форма**
Диоксины	5·10^–8^	5·10^–10^	—	1·10^–8^
Бензо[а]пирен	5·10^–6^	1·10^–6^	—	0,02
Трихлорбифенилы	0,001	—	—	0,03
Пентахлорбифенилы	0,001	—	—	0,1
ДДТ	0,1	5·10^–4^	—	0,1
ГХЦГ	0,02	0,03	—	0,1
N-Нитрозодиметиламин	—	5·10^–5^	—	—
α-Нафтиламин	—	0,003	—	—
Ртуть	5·10^–4^	3·10^–4^	—	2,1
Кадмий	0,001	3·10^–4^	3,0	—
Свинец	0,03	3·10^–4^	6,0	32

В более сложных системах *экотоксичность количественно не измеряется, а оценивается через понятия «экологическая опасность» или «экологический риск»*.

Понятие о риске объединяет две характеристики. С одной стороны, это понятие конкретно: риск от воздействия какого-то фактора или риск для какой-либо возрастной группы и т.д. С другой стороны, понятие имеет вероятностный характер: каковы последствия реализации риска, как они соотносятся с другими рисками и т.д.

Оценка риска — сложный процесс, направленный на установление, оценку и предсказание возможности причинения вреда здоровью человека и обществу в целом, подвергнутому действию химикатов и их побочных продуктов или метаболитов (рис. 9-2).

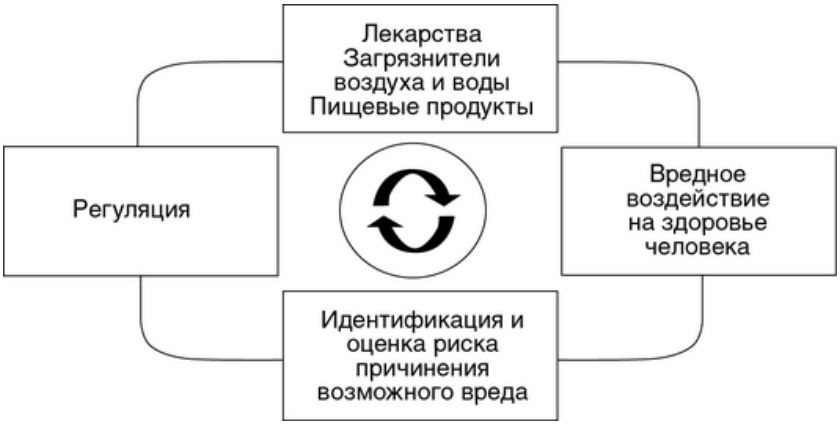


Рис. 9-2. Взаимосвязь неблагоприятного влияния токсикантов на здоровье человека, их идентификация и оценка риска причинения возможного вреда

Оценка риска учитывает несколько основных факторов:

* опасность; * вероятность экспозиции; * соотношение доза–ответ; * восприимчивость организма.

Токсикологическая оценка опирается на многофакторную и обязательно количественную информацию о характере химических веществ и их действия на биосистемы. *Система популяция–токсикант является открытой неавтономной динамической системой, эволюционирующей во времени*. Открытость системы означает наличие потоков биомассы и токсикантов, неавтономность — зависимость потоков от времени.

Для характеристики риска применяют комбинированные методы определения опасности, зависимости доза–ответ и оценки воздействия. При этом экстраполируют (распространяют выводы, полученные из наблюдения над одной частью явления, на другую его часть) воздействие высокой дозы токсиканта на воздействие меньшей дозы, проявление эффекта воздействия токсиканта у животных на человека, используя фактор неопределенности.

К настоящему времени на основании обобщения отечественных и зарубежных данных разработана *единая система оценки токсичности и опасности* химических веществ промышленного происхождения в окружающей среде, интегрирующим критерием в которой является *допустимая суточная доза* (ДСД).

Основным количественным токсикометрическим показателем при установлении ДСД является *пороговая доза хронического действия вещества* (иногда в литературе обозначается как ПДхр) преимущественно при его *пероральном* поступлении с водой (исключения составляют высоколипофильные и высоколетучие вещества).

В качестве количественных критериев оценки риска приняты единые законодательные гигиенические нормативы. Методология оценки риска — важнейший элемент многих разделов медицины и экологии. По разработке способов управления и передачи информации о рисках, эффективных управленческих решений выполнено множество исследований. Однако эта проблема постоянно нуждается в обсуждении специалистами в различных областях медицины, экологии, химии, физики, биологии и других наук, что позволит в случае необходимости принять в конкретных условиях оптимальные решения без неоправданных экономических затрат, дополнительных рисков и ущербов для здоровья человека.

В зависимости *от продолжительности действия экотоксикантов на экосистему* можно говорить об острой или хронической экотоксичности.

Острое экотоксическое действие вещества на биоценоз может быть следствием аварии или катастрофы, сопровождающейся выходом в окружающую среду большого количества относительно нестойкого токсиканта, а также неправильного использования химикатов.

Острое экотоксическое действие *не всегда* приводит к гибели (заболеваниям) людей или представителей других биологических видов *в момент воздействия*. Так, среди отравляющих веществ, применявшихся в Первую мировую войну, был сернистый иприт. Это вещество, являясь канцерогеном, в дальнейшем стало причиной смерти пораженных от новообразований.

С *хронической экотоксичностью* веществ, как правило, ассоциируются сублетальные эффекты. Часто при этом подразумевают нарушение репродуктивных функций, иммунные сдвиги, эндокринную патологию, пороки развития, аллергизацию и т.д. Однако хроническое воздействие токсиканта может приводить и к летальному исходу особей некоторых видов.

В большинстве случаев экотоксикологи сталкиваются с хронической экотоксичностью.

Специфическое и неспецифическое (общетоксическое) действие химических веществ зависит не только от их токсикологических характеристик, но и от генетически обусловленной активности компенсаторно-приспособительных (адаптационных) реакций организма, прежде всего активности иммунной системы и системы биотрансформации ксенобиотиков.

Экологические системы обладают выработанными в процессе эволюции мощными механизмами защиты от экстремальных химических воздействий как на популяционном уровне, так и на уровне отдельных особей.

В настоящее время *скорость антропогенных изменений в биосфере начинает превышать возможности приспособляемости организма к новым условиям среды.*

Одним из наиболее надежных методов, характеризующих воздействие токсичных веществ на здоровье населения, является *оценка уровня их содержания в диагностических биообъектах*. Различные методы оценки воздействия токсикантов широко применяются во многих странах мира. Они являются частью системы мониторинга за определенными показателями состояния здоровья населения, выбранными в качестве индикаторов степени воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды. Специальные программы по определению диоксинов и ПХБ в грудном молоке и крови выполняет ВОЗ, по другим токсичным веществам — Международное агентство по атомной энергии (МАГАТЭ).

Для выявления неблагоприятного воздействия загрязнителей окружающей среды на организм человека проводят определение их содержания как в *природных объектах*, так и в *организме человека*.

При выборе методов определения токсикантов необходимо учитывать, что во многих случаях загрязнение происходит не одним конкретным веществом, а их смесью.

Как правило, выявить *весь комплекс действующих веществ удается редко*. Поэтому в экотоксикологических исследованиях принято использовать методы, позволяющие определять *в одной пробе группу токсикантов*. В связи с достаточно низкими концентрациями экотоксикантов (исключая ситуации химических катастроф) в биосредах для анализа необходимо использовать методы, характеризующиеся высокой чувствительностью. *Нижняя граница определения токсиканта в биосредах должна быть на уровне нижней границы естественного содержания*. Если определяемое вещество в организме не содержится, то при выборе методики целесообразно ориентироваться на биологически допустимый уровень (БДУ). *При этом нижняя граница определения не должна быть выше БДУ.* Например, в результате Чернобыльской катастрофы произошло всем известное загрязнение объектов окружающей среды не только радиоактивными веществами, но и соединениями токсичных металлов, таких как свинец, хром, вольфрам и др. В этом случае использование дорогостоящего чувствительного многоэлементного метода анализа — масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) для мониторинга объектов окружающей среды и эпидемиологического обследования населения было оправдано и весьма полезно.

Традиционно для определения содержания экотоксикантов применяют разнообразные, но о*бязательно высокочувствительные методы: хроматографические, КЭФ, ИСП-МС и др.* Однако эти методы требуют дорогостоящей аппаратуры и высокой квалификации персонала для проведения, в том числе и предшествующей определению каждого биообразца пробоподготовки.

Выбор того или иного диагностического биосубстрата часто обусловливается аналитическими возможностями лаборатории и простотой взятия того или иного биологического образца. При этом желательно учитывать существующий мировой опыт по определению наиболее адекватного диагностического биообъекта, обобщенный в токсикологических профилях, обзорах ВОЗ по токсичным веществам и ряде монографий.

В табл. 9-4 представлены рекомендуемые диагностические биосубстраты и вещества, наиболее значимые как загрязнители окружающей среды населенных пунктов России.

Таблица 9-4. Рекомендуемые диагностические биосубстраты (Б. А. Ревич)

	Токсиканты			
Биосубстрат	**Неорганические соединения**	**Алифатические и ароматические углеводороды**	**Галогенсодержащие углеводороды и гетероциклы**	**Другие соединения**
Кровь*	Al, Ag, Ba, Cd, Co, Cu, F, Pb, Mn (?), Ni, Hg, Se, Zn, Tl, U, V, Cr в эритроцитах		Хлорметан, бромметан, дихлорметан, винилхлорид, трихлорэтилен, диоксины, ПХБ, ГХЦГ, ДДТ и др.	Нитробензол, CO, ацетон
Моча*	Sb, As, Al, Ba, Be, Cd, Ge, Co, Cu, Cr (?), F, Pb, Mn (?), Ni, Hg, Se, Tl, U, Zn, V	Гексан, циклогексан, бензол, ксилол, стирол, этилбензол, триметилбензол, толуол и др.		Нитробензол, анилин, ацетон, фенол, пентахлорофенол
Волосы	As, Pb, Hg, F, Sb, Fe, Cd, Cu, Se, Zn, редкоземельные элементы			
Грудное молоко			Диоксины, ПХБ, гексахлороциклогексан, ДДТ и др.	

^* ^Дискуссионными являются вопросы информативности содержания в моче хрома и марганца, а также марганца в крови.

Для решения вопросов загрязнения окружающей среды в первую очередь необходимо выявлять загрязненные регионы и источники заражения. Экологический контроль неблагоприятных регионов осуществляется во всех развитых странах, однако известно, что этой проблеме все еще уделяется недостаточное внимание. Причинами того, что экологический мониторинг развивается столь медленно, являются техническая сложность, высокая стоимость, а также относительно низкая производительность определения токсикантов при необходимости проведения обследования большого числа объектов, т. е. методики должны быть относительно простые, экспрессные и недорогие. Это касается и массового контроля пищевых продуктов.

Для получения статистически достоверных результатов следует проводить сотни и тысячи определений экотоксикантов в объектах органической и неорганической природы. К современным тест-системам предъявляются следующие основные требования:

* высокая чувствительность; * простота выполнения теста; * непродолжительное время проведения теста; * высокая производительность; * низкая стоимость анализа.

Оценка производительности, стоимости и точности наиболее распространенных в настоящее время методов определения токсикантов показала, что для скрининга биологических образцов на содержание таких экотоксикантов, как пестициды, с экономической точки зрения более удобны экспрессные ИХМ (см. п. 5.2).

9.2. Стойкие органические загрязнители

Мудрец делает то, что он считает нужным;
глупец же считает нужным все, что он делает.

Пинегин Николай Николаевич (1883–1949), русский
и советский писатель, художник, ученый,
исследователь Арктики, член экспедиции Г.Я. Седова

…нужно уметь находить радость во всем:
в небе, в деревьях, в цветах.
Цветы цветут повсюду для всех,
кто только хочет их видеть.

Анри Эмиль Бенуа Матисс (1869–1954),
известный французский художник,
скульптор, лидер течения фовистов

В Программе ООН по защите окружающей среды (United Nations Environmental Project) особо выделена *группа из 12 соединений (СОЗ)*, на которые следует обращать *первоочередное внимание при экологических исследованиях*.

Эта так называемая «грязная дюжина» включает следующие вещества: полихлорированные дибензо-п-диоксины (ПХДД), полихлорированные дибензофураны (ПХДФ), ПХБ, алдрин, диэлдрин, ДДТ, эндрин, хлородан, гексахлорбензол (ГХБ), мирекс, токсафен и гептахлор. Список был составлен в результате многочисленных международных исследований, консультаций и форумов, главным итогом работы которых стало принятие и подписание 22.05.2001 в Стокгольме Глобальной международной конвенции о запрещении СОЗ, к которой присоединилась и Россия.

Приведенный список к 2022 г. расширился за счет включения некоторых полициклических ароматических углводородов, бромированных антипиренов и ряда других веществ. В России действует и особое распоряжение Правительства РФ от 08.07.2015 № 1316 (ред. от 10.05 2019) «Об утверждении перечня загрязняющих веществ, в отношении которых применяются меры государственного регулирования в области охраны окружающей среды».

СОЗ относятся к классу хлорорганических соединений и имеют следующие специфические признаки:

* способность к биоконцентрированию (или биоаккумуляции) за счет высокой липофильности; * глобальная распространенность за счет способности переноситься на большие расстояния; * чрезвычайная стойкость к физическим, химическим и биологическим факторам; * способность оказывать токсическое воздействие на организмы в крайне малых дозах.

Стокгольмская конвенция выдвинула ряд предложений:

* по изучению воздействия СОЗ на человека, животных и растения; * по изучению путей распространения этих веществ; * по запрещению их производства и использования.

Частью этой программы является *эколого-аналитический контроль*, в который входят:

* выявление и оценка источников загрязнения; * определение уровней загрязнения природных и пищевых объектов СОЗ в результате антропогенного воздействия (прямого, косвенного или катастрофического) на окружающую среду и человека.

Особое место среди экотоксикантов занимают группы диоксинов, ПХБ и хлорированных бензолов.

Полихлорированные дибензо-п-диоксины (ПХДД) и полихлорированные дибензофураны (ПХДФ)

В настоящее время насчитывают несколько десятков семейств этих токсикантов, а общее число соединений превышает тысячу.

2,3,7,8-ТХДД (диоксин) — самый токсичный представитель этой группы.

Распространение и применение. Диоксин является одним из продуктов при производстве трихлорфенола, промышленного предшественника гексахлорфена и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4,5-Т). Образование диоксина увеличивается, когда температура в реакционной среде превышает 160 °С. Растворы 2,4,5-Т (оранжевый агент, Agent Orange), широко применявшиеся во Вьетнаме в качестве дефолианта, содержали до 30 ppm диоксина, сейчас такие смеси содержат менее 0,1 ppm. Предполагается, что во время войны в Южном Вьетнаме с 1962 по 1971 г. США было выброшено в атмосферу порядка 170 кг диоксина в качестве примеси к используемому там дефолианту Agent Orange (по другим подсчетам, почти 500 кг). Выброс ядовитого вещества связали с ростом заболеваемости раком печени, онемением конечностей, появлением хлорных угрей (хлоракнэ), изменениями в поведении у ветеранов войны во Вьетнаме и дефектами при рождении их детей. До проведения дефолиации в Южном Вьетнаме рак печени был на восьмом месте среди всех заболеваний раком в стране, что составило примерно 2,9% общего количества злокачественных заболеваний. В 1979 г. рак печени был уже на втором месте — примерно 10% общего количества заболеваний раком. Заболеваемость раком печени в Ханое, Северном Вьетнаме (который не был подвержен прямому распылению) не изменилась. Рак печени является следствием *хронического воздействия малых доз* диоксина у животных.

Было обнаружено, что диоксин *сверхстабилен и устойчив в окружающей среде*.

Ежесуточное предельно допустимое поступление диоксина в организм человека в разных странах определено по-разному — от 1 до 200 пг / кг массы. В Российской Федерации установлен единый регламент на содержание ПХДД и ПХДФ *в почве* — 0,133 пг / г.

Среднее дневное поступление в организм человека составляет около 0,05 нг, 98% которого поступает с пищей.

Концентрации в крови. Диоксин в сыворотке крови определяется в концентрации в среднем до 5 нг / л, *T*~1 / 2~ диоксина составляет в среднем 7,1 года.

Диоксин — гидрофобное соединение, имеющее тенденцию к кумуляции в *жировой ткани*, обнаружен и в поджелудочной железе, и в печени. Неизвестно, метабилизируется ли это вещество в организме человека. Основной путь экскреции — с калом. Жировая ткань человека содержит в среднем 7,4 мкг / кг диоксина по сравнению с 80 мкг / кг у людей, подвергнувшихся его воздействию.

Токсичность. В табл. 9-5 представлены концентрации диоксина у человека, подвергавшегося его воздействию.

Таблица 9-5. Концентрации диоксина у человека, подвергавшегося его воздействию, мкг/кг

Кровь	Мозг	Легкие	Печень	Поджелудочная железа	Почка	Жировая ткань
0,006	0,06	0,06	0,15	1,04	0,04	1,84

Методы определения. Уровень диоксина в биологических пробах очень мал, и для его обнаружения требуются высокочувствительные и специфичные методы определения — ГХ-МС или ВЭЖХ (рис. 9-3, 9-4).

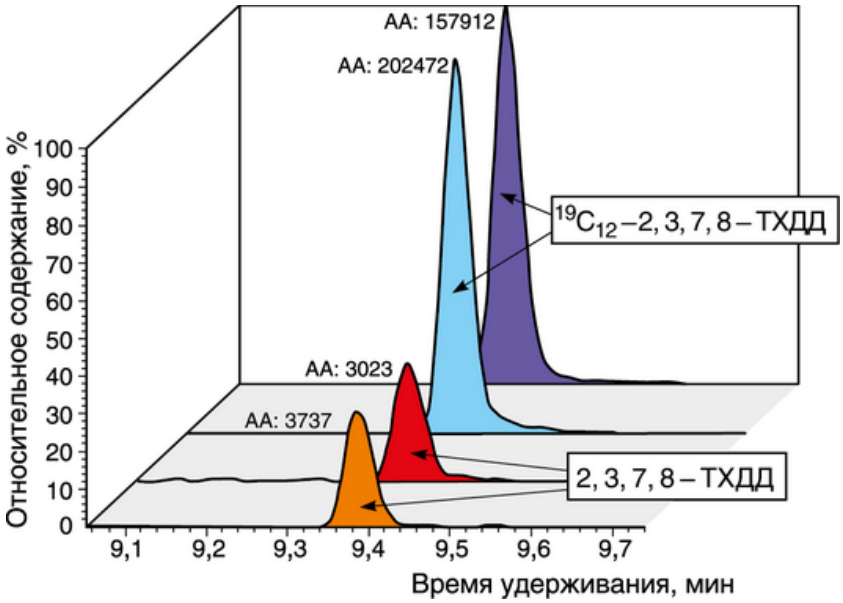


Рис. 9-3. Масс-хроматограмма 2,3,7,8-тетрахлордибензо-р-диоксин, полученная на приборе MAT 95 XP, Thermo Finnigan

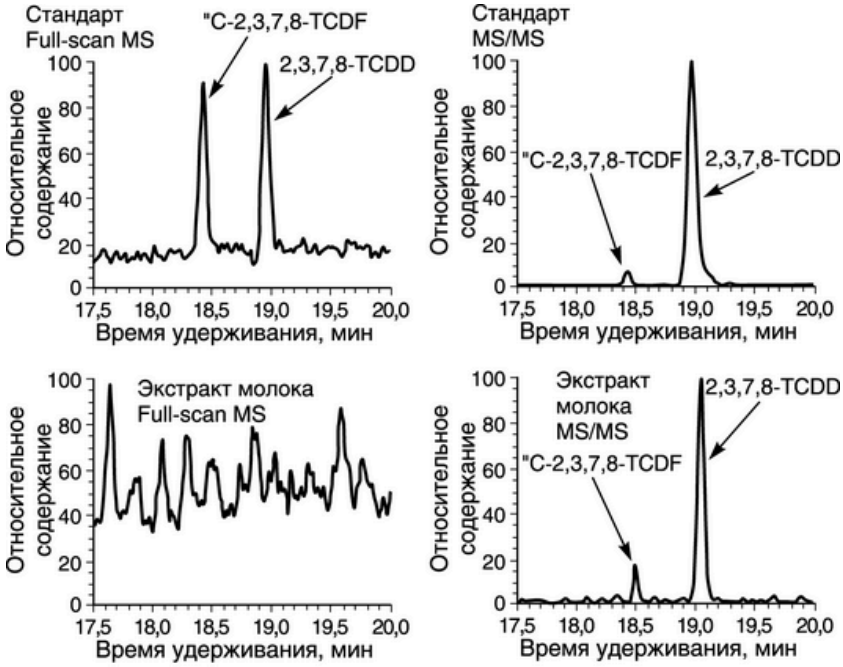


Рис. 9-4. Хроматограммы стандартов — 2,3,7,8-тетрахлордибензофурана (2,3,7,8-ТХДФ, 2,3,7,8-TCDF) и 2,3,7,8-тетрахлордибензо-*р*-диоксин (2,3,7,8-TCDD) (вверху) и реального образца (внизу) по полному масс-спектру (МС) (слева) и тандем масс-спектру (МС-МС) (справа)

На рис. 9-5 показаны модели молекул 2,3,7,8- ТХДФ и 2,3,7,8-ТХДД.

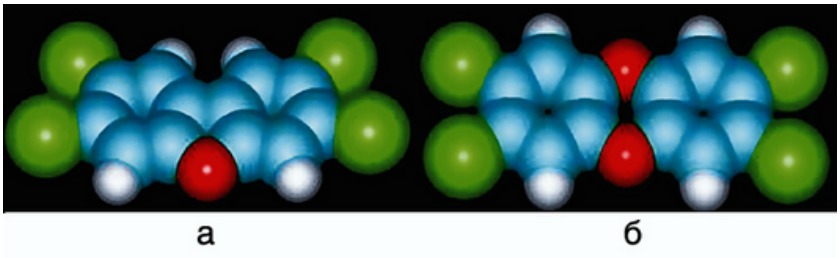


Рис. 9-5. Модели молекул 2,3,7,8-тетрахлордибензофурана (*а*) и 2,3,7,8-тетрахлордибензо-*р*-диоксина (*б*): голубым цветом обозначены атомы углерода, серым — атомы водороды, зеленым — атомы хлора, красным — атомы кислорода

На рис. 9-6 показаны хроматограммы изомеров хлорбензофуранов, выделенных из экстракта печени трупа и идентифицированных по молекулярным ионам (метод ГХ-МС).

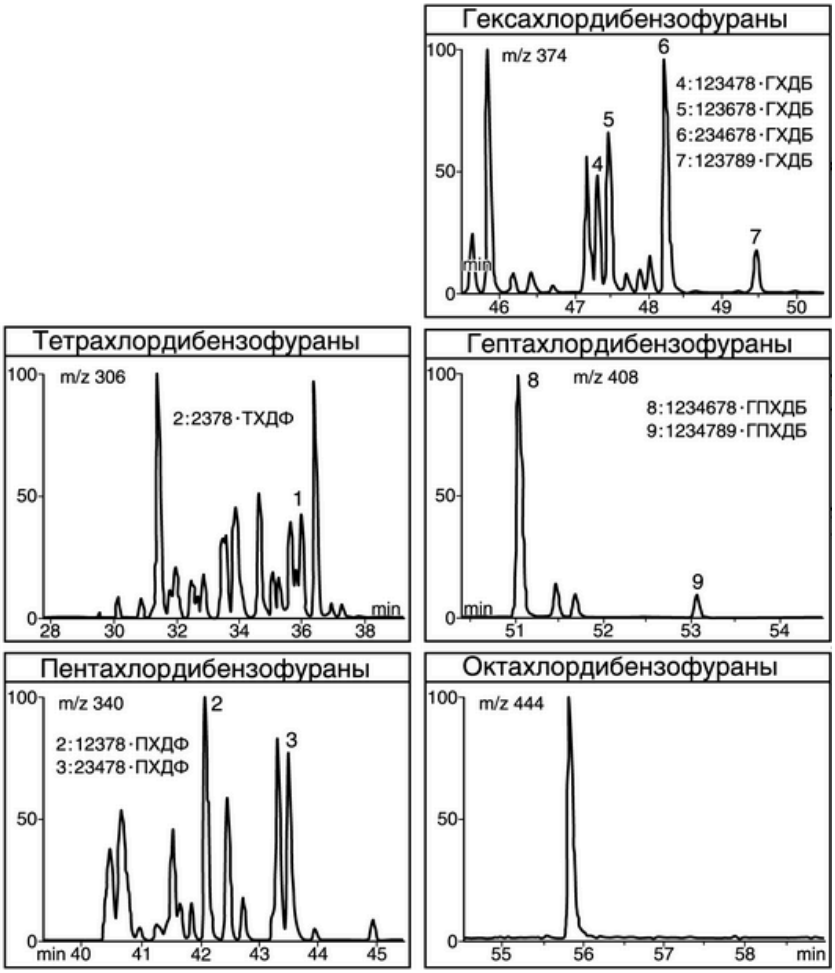


Рис. 9-6. Хроматограммы изомеров хлордибензофуранов, молекулярные ионы которых идентифицированы

Коэффициенты токсичности для ПХДД и ПХДФ относительно 2,3,7,8-ТХДД приведены в табл. 9-6.

Таблица 9-6. Коэффициенты токсичности гептахлордибензо-р-диоксина и гептахлордибензофурана относительно 2,3,7,8-ТХДД

Группа изомеров	Изомеры	Коэффициент токсичности (международный, 1989 г.)	Коэффициент токсичности (ВОЗ, 1998)		
			для млекопитающих	для рыб	для птиц
ТХДД	2,3,7,8	1	1	1	1
	Остальные	0	0	0	0
ПеХДД	1,2,3,7,8	0,5	1	1	1
	Остальные	0	0	0	0
ГкХДД	1,2,3,4,7,8	0,1	0,1	0,5	0,05
	1,2,3,6,7,8	0,1	0,1	0,01	0,01
	1,2,3,7,8,9	0,1	0,1	0,01	0,1
	Остальные	0	0	0	0
ГпХДД	1,2,3,4,6,7,8	0,01	0,01	0,001	<0,001
	Другой	0	0	0	0
ОХДД		0,001	0,0001	<0,0001	0,0001
ТХДФ	2,3,7,8	0,1	0,1	0,05	1
	Остальные	0	0	0	0

	1,2,3,7,8	0,05	0,05	0,05	0,1
ПеХДФ	2,3,4,7,8	0,5	0,5	0,5	1
	Остальные	0	0	0	0
	1,2,3,4,7,8	0,1	0,1	0,1	0,1
	1,2,3,6,7,8	0,1	0,1	0,1	0,1
ГкХДФ	2,3,4,6,7,8	0,1	0,1	0,1	0,1
	1,2,3,7,8,9	0,1	0,1	0,1	0,1
	Остальные	0	0	0	0
	1,2,3,4,6,7,8	0,01	0,01	0,01	0,01
ГпХДФ	1,2,3,4,7,8,9	0,01	0,01	0,01	0,01
	Остальные	0	0	0	0
ОХДФ		0,001	0,0001	<0,0001	0,0001

Примечание. ГкХДД — гексахлордибензо-р-диоксин; ГкХДФ — гексахлордибензофуран; ГпХДД — гептахлордибензо-р-диоксин; ГпХДФ — гептахлордибензофуран; ОХДД — октахлордибензо-р-диоксин; ОХДФ — октахлордибензофуран; ПеХДД — пентахлордибензо-р-диоксин; ПеХДФ — пентахлордибензофуран; ТХДФ — тетрахлордибензофуран.

Достижения аналитической химии и приборостроения позволили перевести изомероселективное определение ПХДД и ПХДФ из разряда уникальных анализов в категорию выполняемых серийно, но по-прежнему такие работы весьма трудоемки. Наиболее надежным методом определения содержания ПХДД и ПХДФ в различных матрицах является метод изотопного разбавления с детектированием с помощью ГХ-МС высокого разрешения, что обеспечивает высокую чувствительность и селективность, необходимые при таком анализе.

Хромато-масс-спектрометр высокого разрешения Finnigan MAT 95XP — один из приборов, сертифицированных для данного типа определений. Он удовлетворяет требованиям методик US-EPA 1613, 8290 и 1668, являющихся основой методов ультраследового определения диоксинов и ПХБ в мире.

В настоящее время в России имеется 10 стандартизованных методик, позволяющих качественно выделять и анализировать ПХДД и ПХДФ. Они внесены в реестр Госстандарта РФ. Методики включают отбор проб, внесение изотопно-меченных стандартов (метод изотопного разбавления), экстракцию, очистку на многослойной (кислотно-щелочной) колонке с активированным углем, колонке с оксидом алюминия и собственно хромато-масс-спектрометрическое определение.

Для большинства образцов может быть использована схема определения этих экотоксикантов, представленная на рис. 9-7.

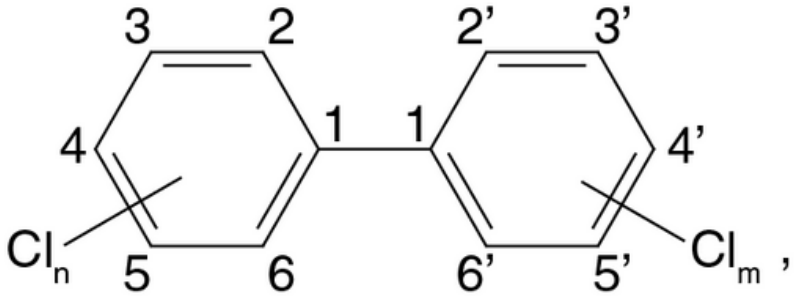


Рис. 9-7. Схема обнаружения гептахлордибензо-р-диоксина и гептахлордибензофурана в биообъектах и объектах окружающей среды

Полихлорированные бифенилы

Среди СОЗ наиболее распространены *ПХБ*. Они массово производились и использовались начиная с 1929 г. С тех пор и до прекращения их промышленного выпуска в 1986 г. в мире было произведено около 2 млн т ПХБ.

ПХБ относят к классу ароматических соединений, состоящих из двух бензольных колец, соединенных связью С–С и замещенных 1–10 атомами хлора в *орто*-, *мета*- или *пара*-положениях (рис. 9-8). Существует 209 индивидуальных химических структур ПХБ, отличающихся числом и положением атомов хлора в молекуле, имеющих общую формулу C~12~H~10 – ~~*x*~Cl~*x*~, где *x* = 1–10.



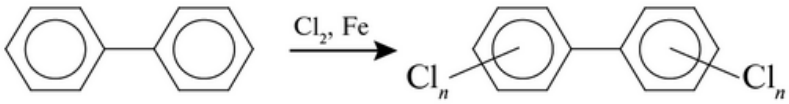
где n, m = 0–5.

Рис. 9-8. Структурная формула полихлорированных бифенилов

По своим физико-химическим свойствам ПХБ близки к диоксинам. Размер молекулы в длину 9–10,5 Å, в ширину около 3 Å. ПХБ обладают рядом *уникальных физических и химических свойств*: исключительной термостойкостью и электроизоляционными характеристиками, инертностью по отношению к кислотам и щелочам, огнестойкостью, хорошей растворимостью в жирах, маслах и органических растворителях, высокой совместимостью со смолами, отличной адгезивной способностью.

Такие свойства ПХБ находили широкое применение при производстве электрооборудования, в частности трансформаторов и усилителей (охлаждающие жидкости), а также в качестве наполнителей при производстве красителей и пестицидов, смазочных материалов для турбин, гидравлических систем, текстиля, бумаги, флуоресцентных ламп, телевизоров и др.

В основе промышленного получения ПХБ лежит реакция электрофильного замещения S~E~ — хлорирование бифенила в присутствии катализатора (кислоты Льюиса).



Степень хлорирования зависит от продолжительности реакции, которая составляет от 12 до 36 ч. Реакция хлорирования бифенила проходит неспецифически, поэтому продукт содержит смесь большого количества индивидуальных ПХБ — от 30 до 100 соединений. Большинство из них имеет от 3 до 8 атомов хлора, хотя встречается и некоторое количество как более, так и менее хлорированных ПХБ. Эти смеси известны под различными фирменными названиями: «Арохлор» (США), «Канехлор» (Япония), «Хлорфен» (Германия), «Делор» (Словакия), «Фенохлор» (Франция), «Фенхлор» (Италия), «Совол» и «Совтол» (Россия), состав которых регламентирован.

Характер и динамика распределения ПХБ в окружающей среде во многом определяются их свойствами: химической инертностью, достаточно высокой плотностью паров и способностью сорбироваться на частицах.

Несмотря на постепенное сокращение применения ПХБ в хозяйственной деятельности, они продолжают загрязнять окружающую среду, и в настоящее время эти токсичные продукты, распространившиеся по всему земному шару, присутствуют в организме каждого из нас. По мере включения ПХБ в биологические пищевые цепи происходит прогрессивная потеря низкохлорированных компонентов благодаря их селективной биотрансформации. Поэтому в организмах человека и животных накапливаются *наиболее опасные высокохлорированные ПХБ*.

По данным ВОЗ, основными путями поступления ПХБ в окружающую среду являются:

* испарения из пластификаторов; * выделение при сжигании бытовых и промышленных отходов, а также при возгорании трансформаторов, конденсаторов и другого промышленного оборудования, в котором используются ПХБ; * утечки с другими промышленными отходами; * вывоз ПХБ на свалки и поля аэрации; * другие неконтролируемые пути.

В России ПДК установлены только для промышленных смесей ПХБ. В качестве стандартной смеси, по которой производился расчет ПДК, был принят Арохлор 1254. ПДК для ПХБ имеют следующие значения:

* атмосферный воздух — 1 мкг / м^3^; * воздух рабочей зоны — 1 мг / м^3^; * вода (водные объекты хозяйственного и культурно-бытового водопользования) — 1 мкг / л; * почва — 0,1 мг / кг; * пищевые продукты (в пересчете на жир): молоко — 1,5 мг / кг; рыба — 5 мг / кг.

Помимо названных нормативных величин ПДК в питьевой воде равны:

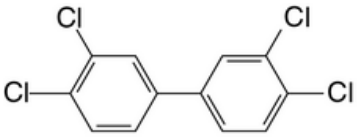
* монохлорбифенилов — 1 мкг / л; * дихлорбифенилов — 1 мкг / л; * трихлорбифенилов (ТрХБ) — 1 мкг / л; * пентахлорбифенилов (ПеХБ) — 1 мкг / л.

ПДК в почвах равны:

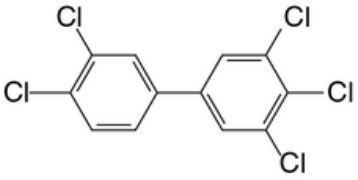
* ТрХБ — 0,03 мг / кг; * тетрахлоробифенилов (ТХБ) — 0,06 мг / кг; * ПеХБ — 0,1 мг / кг.

Однако возможность применения этих нормативов не обоснована ни имеющейся приборно-методической базой, ни тем, что ПХБ не встречаются отдельно, а только в виде смесей.

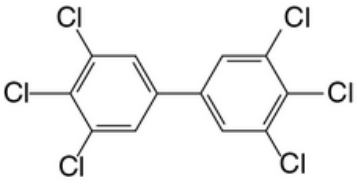
Существуют большие различия в токсичности, способности к биоаккумуляции и биотрансформации для различных ПХБ. Производные, не содержащие атомы хлора в *орто*-положении молекулы (*орто*-незамещенные ПХБ), могут принимать планарную конфигурацию, которая энергетически наиболее выгодна (рис. 9-9) и являются диоксиноподобными ПХБ.



а – № 77, 3, 3’, 4, 4’-ТХБ.



б – № 126, 3, 3’, 4, 4’, 5-ПеХБ.



в – № 169, 3, 3’, 4, 4’, 5, 5’-ГкХБ.

Рис. 9-9. Структурные формулы наиболее токсичных производных *орто*-незамещенных полихлорированных бифенилов: 3,3',4,4'-тетрахлорбифенил (*а*); 3,3',4,4',5-пентахлорбифенил (*б*); 3,3',4,4',5,5'-гексахлорбифенил (*в*)

Орто-незамещенные ПХБ являются наиболее токсичными и оказывают действие, аналогичное действию ПХДД и ПХДФ.

Механизм действия *орто*-незамещенных и моно-*орто*-замещенных ПХБ аналогичен механизму действия 2,3,7,8-ТХДД.

Современные методы и подходы, используемые при анализе объектов окружающей среды на содержание ПХБ, позволяют определять все производные, несмотря на то что ни одна хроматографическая колонка не может в настоящее время разделить все 209 компонентов ПХБ.

Доминирующими методами являются:

* ГЖХ с использованием селективного к хлорсодержащим соединениям ЭЗД; * сочетание ГХ с МС низкого разрешения; для определения планарных ПХБ (№ 77, 81, 126, 169) сочетание ГХ с МС высокого разрешения.

Эти методы позволяют разрешать любые проблемы, связанные с детектированием ПХБ независимо от характера природной матрицы.

Выбор метода определения зависит от конечной цели анализа. Если необходимо знать суммарное или групповое содержание ПХБ, то используют обычно ГЖХ. Если же ставится задача обнаружения определенного вещества из группы ПХБ (например № 77 или № 169), то применяют более сложные и дорогостоящие селективные методы.

Определения суммарного содержания ПХБ в объектах окружающей среды. В данном случае количественное определение ПХБ осуществляется сравнением хроматографического профиля анализируемого образца с профилем стандартных технических смесей. Такой анализ проводится, как правило, методами ГХ-ЭЗД и ГХ-МС.

На хроматографической колонке ПХБ не разделяются на индивидуальные изомеры, они элюируются в виде кластеров, редко достигая базовой линии. Для градуировки используют различные коммерческие смеси, обычно смеси Арохлор, идентификация осуществляется исключительно по времени удерживания.

В случаях когда проба содержит только одну техническую смесь, эта методика дает удовлетворительные результаты, но если проба загрязнена двумя техническими смесями и более в неизвестном соотношении, то ни одна из технических смесей Арохлор не может быть взята в качестве стандарта, иначе это приведет к ошибкам определения. Кроме того, вместе с ПХБ могут элюироваться и другие загрязнители, такие как бутилмонохлордифениловые эфиры, изопропилхлоробифенилы, хлорбензолы, хлоруглеводороды (некоторые пестициды), которые не идентифицируются, но включаются в общую сумму ПХБ. Несмотря на неточность, метод прост и удобен.

Для такого рода анализа можно также использовать масс-спектрометрический детектор, который заметно увеличивает селективность. Он обладает не менее высокой чувствительностью, чем ЭЗД, и позволяет осуществлять идентификацию на основании структурной информации по молекулярным и осколочным ионам в МС. Высокая чувствительность в ГХ-МС достигается при использовании селективного детектирования выбранных ионов. Характерная картина изотопного распределения хлорсодержащих ионов дает дополнительные возможности для идентификации.

Концепция определения суммы ПХБ имеет ряд недостатков с точки зрения как их содержания в окружающей среде и технических смесях, так и токсического действия. Определение суммы ПХБ без идентификации их состава используют только для предварительной оценки загрязнения.

В воздухе, организме рыб, донных отложениях, почве, растительных материалах обычно обнаруживается до 100 индивидуальных производных бифенилов. Поскольку физико-химические и токсические свойства изомеров ПХБ сильно различаются, то необходимо проводить селективное определение. Например, изменение профиля изомеров может дать информацию о связи между структурой ПХБ и их распространением в природе или биотрансформацией в организме. Однако нельзя определять ограниченное число производных, это может привести к недооценке общей суммы ПХБ.

Включение в расчет диоксиновой нагрузки и риска наряду с ПХДД и ПХДФ диоксиноподобных ПХБ привело к модификации методики определения ПХБ. К диоксиноподобным относятся планарные производные ПХБ, не содержащие атомов хлора в *орто*-положении и некоторые моно-*орто*-замещенные производные. Их концентрации обычно малы. Если требуются надежная идентификация и точное определение содержания изомеров, то обычно используют ГХ-МС (низкого или высокого разрешения), так же как и для определения ПХДД и ПХДФ (см. рис. 9-7).

Хлорированные бензолы

Хлорированные бензолы — группа химических соединений, используемых в качестве органических растворителей, пестицидов, фунгицидов, компонентов химического синтеза. Они представляют собой молекулу бензола, в которой атомы водорода замещены 1–6 атомами хлора.

Как правило, люди подвергаются воздействию этих веществ на производстве, однако в последнее время достаточно высокие концентрации хлорированных бензолов стали обнаруживать в воздухе, почве, продовольствии, воде. Чем выше степень хлорирования молекулы, тем ниже растворимость в воде и летучесть веществ.

Исследования на животных свидетельствуют о способности таких соединений (гексахлорбензола, дихлорбензола) вызывать карциному печени, почек и аденому паращитовидной железы. Исследования хлорированных бензолов на генотоксичность дают отрицательный результат. Нет достоверных данных о канцерогенности хлорированных бензолов для человека.

9.3. Соединения металлов как экотоксиканты

Здесь воздух, как земля, тяжел.
Здесь воздух давит, как свинец.
Кричу,
Кричу,
Кричу,
Кричу:
— Идите! —
людям я кричу. —
Свинец
расплавить
Я хочу!

Назым Хикмет Ран (1902–1963), известный
турецкий поэт, писатель, драматург, основатель
турецкой революционной поэзии.
Граждани СССР с 1951 г., общественный
деятель. Лауреат Международной премии Мира (1950)

Ниже представлена краткая информация о металлах как экотоксикантах.

Металлы в различных концентрациях находятся в почве, осадочных породах, в воде и воздухе. Важнейшее свойство металлов — их устойчивость. Они осаждаются на поверхности земли из воздуха, уходят из почвы и воды в растения, передаются по пищевой цепи и биоаккумулируются, вновь выводятся в окружающую среду посредством экскреции или разложения мертвых организмов. В трансформации и транспорте соединений металлов в окружающей среде, кроме естественных биогеохимических циклов, большую роль играет деятельность человека. Люди часто подвергаются воздействию бóльших, чем фоновые, или даже опасных уровней металлов в условиях окружающей среды из-за изменения естественных биогеохимических циклов. Более 10 лет назад специалисты Центра экологического мониторинга и контроля Свердловской области провели исследования *желтого снега*, выпавшего вблизи г. Михайловска. Анализ данных показал, что во всех пробах снега наблюдается превышение концентрации марганца, никеля и железа, в некоторых — превышение концентраций хрома, свинца, цинка, меди и кадмия. Эти загрязнения характерны для выбросов предприятий черной и цветной металлургии.

Биологические реакции организмов на изменение содержания химических элементов в окружающей среде изучал наш выдающийся соотечественник В. В. Ковальский (рис. 9-10).

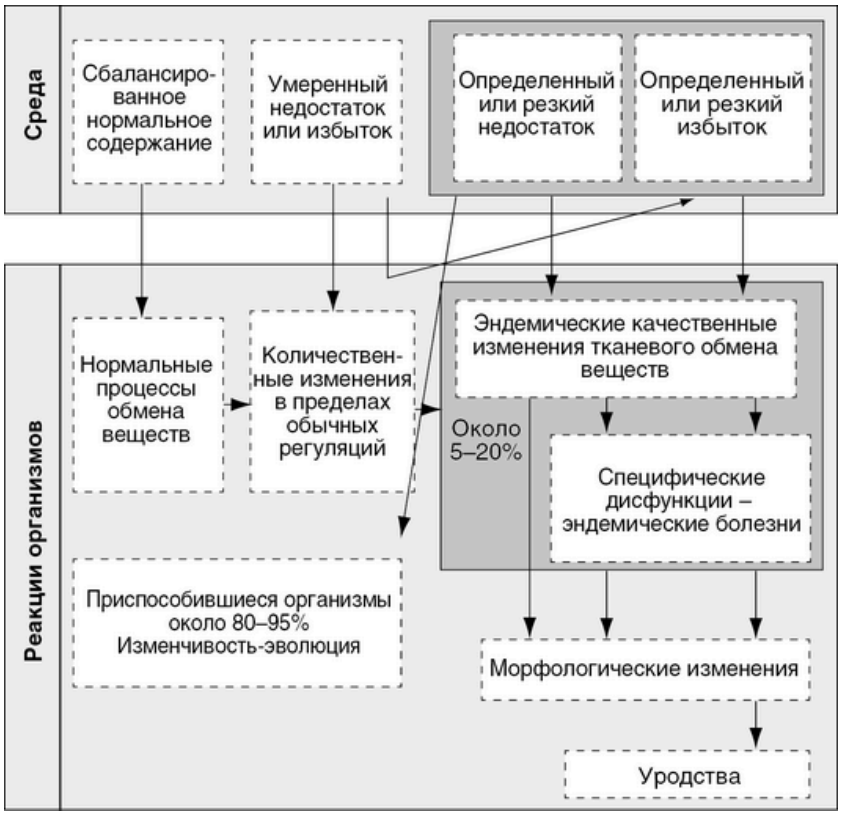


Рис. 9-10. Биологические реакции организмов на изменение содержания химических элементов в окружающей среде (по В. В. Ковальскому)

Нередко практикующие врачи (все еще из-за недостатка в базовом медицинском образовании научной информации о роли и значении микроэлементов для организма человека, получаемой химиками, биологами, медиками) ограничиваются рекомендациями приема биодобавок, содержащих тот или иной МЭ, не зная его взаимосвязи с другими МЭ или биолигандами (см. п. 7.5).

Так, далеко не все акушеры-гинекологи знают, что высокий уровень антропогенной нагрузки на систему мать–плод приводит к дисбалансу МЭ в биосредах фетоплацентарного комплекса. В РФ за последние годы на основании определения содержания МЭ в почве и питьевой воде на территории ряда районов с различной степенью антропогенного загрязнения и уровня накопления МЭ в плаценте и крови плода были выявлены приоритетные территориальные экотоксиканты для биосред фетоплацентарного комплекса.

Свинец. В разных странах мира осуществляются *национальные программы* по определению свинца в биосредах населения.

В России данные о *содержании свинца в крови детей* сопоставимы с ранее опубликованными данными по загрязненным территориям других стран.

За последние 10 лет во многих странах уточнены результаты выполненных ранее исследований по оценке связи между содержанием свинца в крови ребенка и выраженностью тех или иных отклонений в состоянии здоровья. Биологической ПДК свинца или, как ее еще называют, «уровнем обеспокоенности или настороженности», принята величина *10 мкг / дл крови*, превышение которой сопровождается снижением способности к обучению и поведенческими нарушениями. Однако при содержании свинца в крови ребенка даже ниже этой величины нередко у детей могут наблюдаться определенные изменения нервно-психического характера, негативные последствия которых оказывают влияние спустя годы. При содержании свинца в крови беременных женщин более 15 мкг / дл возрастает риск спонтанных абортов, поэтому этот уровень рекомендован как допустимый для беременных. Кроме того, в настоящее время рассматривается роль свинца как фактора риска развития остеопороза женщин в постклимактерическом периоде.

Для прижизненного определения содержания свинца в организме детей используют математическое моделирование, основанное на установлении взаимосвязей между содержанием свинца в крови детей

и окружающей среде — воздухе, воде, почве, пыли.

Во многих исследованиях в разных странах мира используют определение свинца в волосах у детей и взрослых методом ИСП-МС для оценки эколого-эпидемической ситуации (рис. 9-11). На рисунке видно, что с ростом уровня свинца снижается содержание селена в организме детей (см. п. 7.5).

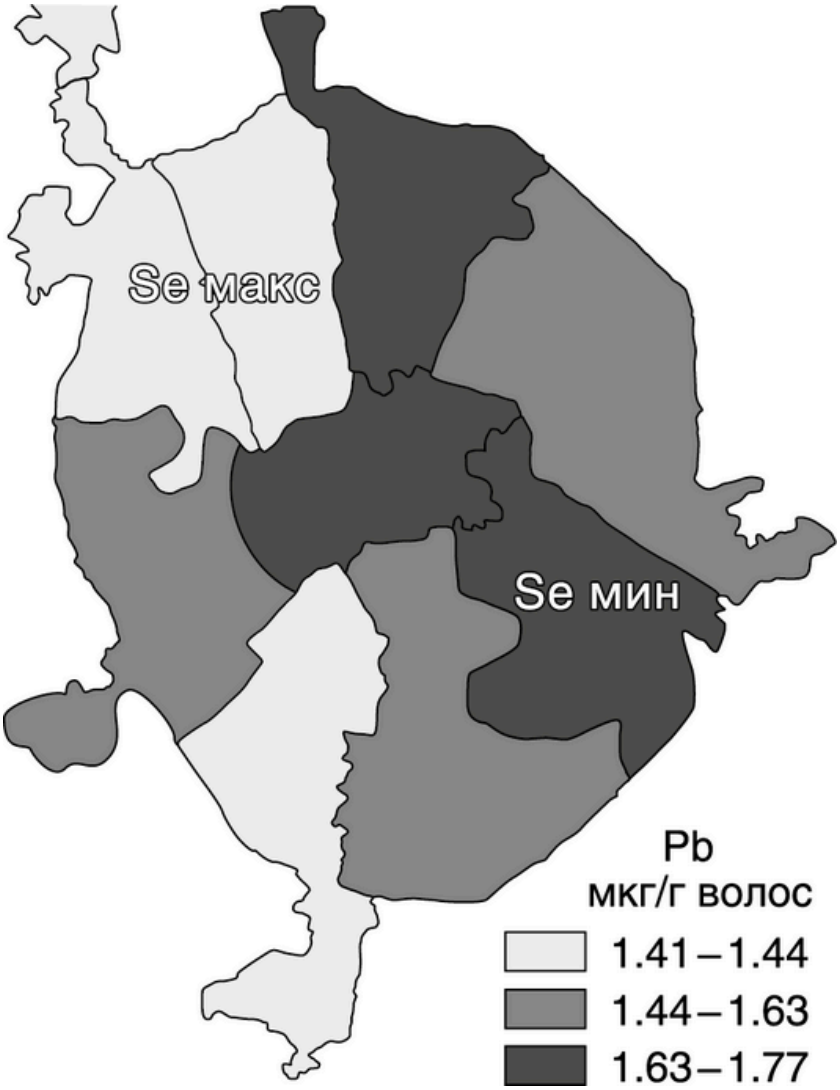


Рис. 9-11. Содержание свинца и селена в волосах детей Москвы (по Ю.Н. Лобановой); метод определения элементов — ИСП-МС

В РФ принят *фоновый уровень свинца:* в волосах взрослых 2–4 мкг / г, в крови — 20 мкг / 100мл.

Для детей БДУ свинца ***в волосах*** не должен превышать 9 мкг / г. Так называемый уровень обеспокоенности для детей составляет 5 мкг / г.

БДУ свинца в волосах для рабочих, контактирующих со свинцом на производстве, составляет 80–100 мкг / г.

В экологических исследованиях часто применяют хроматографические методы. Например, извлечение целевых компонентов из крови или мочи осуществляют из паровой фазы методом ТФМЭ. Микроконцентрации свинца в цельной крови и моче определяют методом ГХ-ПИД после превращения Pb^2+^ (по реакции с тетраэтилборатом натрия) в летучее производное — тетраэтилсвинец (C~2~H~5~)~4~Pb и улавливания конечного продукта из паровой фазы (4 мл) шприцем с полидиметилсилоксановым волокном (100 мкм). Шприц с концентратом аналита вводят в испаритель хроматографа. После термодесорбции целевые компоненты разделяются на кварцевой капиллярной колонке (30 м × 0,25 мм) с силиконом SPB-5 при программировании температуры (40–120 °C) со скоростью 20 °C / мин (газ-носитель He).

Методом инверсионной вольтамперометрии определяют содержание свинца в цельной крови, исключая стадию предварительной подготовки пробы. Разработка новых толстопленочных и screen-printed электродов позволила

создать портативные сенсоры, уменьшив тем самым необходимый для анализа объем пробы до 1 мл, а с помощью модифицированных сенсоров этот объем можно уменьшить до 50 мкл. Для исключения металлической ртути и ее солей из определения поверхность рабочего электрода модифицируется малорастворимой солью — диэтилдитиокарбаминатом ртути(II). Измерительная ячейка имеет объем 0,2–0,4 мл. Определение проводится в три стадии: формирование рабочей поверхности, накопление, регистрация.

Ртуть**.** Общий выброс ртути в атмосферный воздух только от промышленных источников достигает, по экспертным оценкам, 20 т в год, продолжается использование ртутьсодержащих пестицидов (в складских помещениях находится до 1000 т этих веществ), есть и другие источники поступления ртути в организм человека. Установлена корреляция между уровнем потребления морепродуктов и концентрацией ртути в крови людей.

В РФ принят *фоновый уровень ртути*: в крови — 2 мкг / 100 мл, в моче — 2–5 мкг / л, в волосах — 0,5–0,9 мкг / г. БДУ ртути: в крови — 5 мкг / 100 мл, в моче — 10 мкг / л, в волосах — 0,9 мкг / г.

В эколого-эпидемиологических исследованиях наиболее широко применяется определение накопления ртути в волосах (см. п. 5.4.3. и п. 7.5).

Для оценки избыточного содержания Hg в организме при обследовании больших групп людей используют метод ИСП-МС (рис. 9-11).

Повышенное поступление ртути в организм изменяет содержание других элементов. Например, в табл. 9-7 приведено среднее содержание химических элементов в волосах рабочих, контактирующих с ртутью на производстве и у жителей Москвы.

Таблица 9-7. Среднее содержание химических элементов в волосах рабочих, контактирующих с ртутью на производстве, и у жителей г. Москвы, мкг / г

Элемент	**Рабочие** ***n*** **= 60**	**Жители г. Москвы** ***n*** **= 16 915**
Ca	1166,0±106,0	1153,0±10,0
Cu	17,20±1,19	16,4±0,1
Fe	38,69±7,57	20,4±0,3
Hg	**11,55±1,741**	**0,96±0,02**
I	**1,42±0,20**	**9,41±2,42**
K	**468,0±93,01**	**183,0±3,0**
Mg	170,0±15,0	120,0±1,0
P	216,0±12,0	173,0±2,0
Se	**0,34±0,02**	**0,98±0,06**
Zn	178,0±6,0	206,0±1,0

Примечание. Достоверность различий (P <0,001).

При определении органических и неорганических соединений ртути в биообъектах используют различные методы, например хорошие результаты дает применение гибридных методов ГХ-ИСП-АЭС или ГХ-ААС. (см. гл. 5). После экстракции из крови образец дериватизируют и получают бутилпроизводные ртути, которые анализируют методом ГХ-ИСП-АЭС или ГХ-ААС. Возможно использование для этих целей (после этилирования) криогенной ГХ с атомно-флуоресцентным детектированием холодного пара или нейтронно-активационного анализа в сочетании с экстракцией соединений ртути из образцов крови (см. гл. 5). Относительное стандартное отклонение результатов измерений составляет 0,06–0,09. При криогенном концентрировании чувствительность увеличивается в 20 раз. Предел определения 0,2–0,6 мкг / л.

Кадмий. Впервые БДУ кадмия в моче (9 мкг / л) был установлен в Японии в 1970 г. Впоследствии в США был предложен более низкий уровень — 5 мкг кадмия на 1 г креатинина (7 мкг / л мочи).

В РФ БДУ кадмия в волосах принят равным 2 мкг / г, среднее содержание кадмия в волосах составляет 0,05–0,25 мкг / г.

Содержание кадмия в металлотионеине — самый надежный критерий выявления хронического воздействия токсиканта и имеет гораздо большее токсикологическое значение, чем общее содержание кадмия. Однако его определение требует применения дорогостоящих методов исследования, например КЭ-ИСП-МС.

В России индикатором *хронического воздействия* кадмия считают концентрацию кадмия в моче при низких уровнях его поступления и отсутствии заболеваний почек. Среднее содержание кадмия в моче составляет 0,03–5,0 мкг / л.

Определение концентрации кадмия в крови используют преимущественно как показатель его текущего поступления в организм.

При длительном *воздействии повышенных доз* токсиканта содержание кадмия в волосах отражает уровень его накопления в организме.

Марганец. У рабочих, занятых добычей марганцевых руд, существенно повышена смертность. На первом месте среди причин смерти стоят злокачественные новообразования (36%), далее идут сердечно-сосудистые заболевания (25,4%), болезни органов дыхания (22%), цирроз печени (12,4%).Токсическое действие марганца на производстве обусловлено преимущественно вдыханием дыма и реже — пероральным поступлением с водой или продуктами питания.

ПДК марганца в воздухе рабочих помещений равна 0,05 мг / м^3^ по диоксиду марганца и 0,03 мг / м^3^ по металлу. Признаки и симптомы влияния марганца на ЦНС проявляются при концентрации его в воздухе 2–5 мг / м^3^. Полагают, что максимально допустимый уровень марганца в воздухе рабочей зоны должен быть менее 1 мг / м^3^.

Для оценки экспозиционного риска токсического действия марганца используют определение его концентрации в волосах. Отмечают прямую зависимость между концентрацией марганца во вдыхаемом воздухе и в волосах, например, электросварщиков. Содержание марганца в волосах отражает процесс длительного поступления токсиканта и накопления его в организме. Установлена также прямая зависимость между выраженностью воздействия марганца и его концентрацией в волосах. Полагают, что ориентировочная лимитирующая концентрация марганца в волосах не должна превышать 3 мкг / г. Среднее содержание марганца в волосах колеблется в пределах 0,2–2,0 мкг / г.

Корреляция между уровнем марганца в сыворотке, цельной крови, моче и клиническими проявлениями его воздействия не выявлена. Поэтому диагностическая значимость определения марганца в крови до сих пор однозначно не установлена. Не выявлено достоверной связи между концентрацией марганца в крови и продолжительностью его воздействия. Концентрация марганца в крови не связана и со стадией хронической марганцевой интоксикации. Полагают, что определение содержания марганца в крови имеет лишь прогностическое значение: чем выше уровень металла в крови, тем более вероятно прогрессирование заболевания. Среднее содержание марганца в плазме крови 0,3–1,0 мкг / л, в моче 0,1–1,5 мкг / л.

Кроме определения металла в волосах и крови, для диагностики интоксикации марганцем рекомендуют биохимические тесты.

В России принята *стандартная (официальная) методика* определения ряда тяжелых металлов, например железа, никеля, цинка и других ***в желчи***, которая заключается в прямом определении целевых компонентов методом ААС (Fe при 248,3 нм, Zn при 213,9 нм и Ni при 232,0 нм). Отбор проб желчи производят в стерильную химически чистую посуду при дуодональном зондировании. Для консервирования пробы в пробирку вносят 0,05 мл хлороформа. Пробы можно хранить в холодильнике в течение 3 сут. Для приготовления стандартных растворов исследуемых металлов для калибровки прибора используют бидистиллированную воду. Основной стандартный раствор готовят из стандартного образца с концентрацией металла 1,05–0,95 г / мл путем разведения 0,1 н азотной кислотой в мерной колбе на 100 мл.
Диапазон определяемого содержания: 0,1–1,5 мкг / мл (железо), 1–5 мкг / мл (цинк), 0,5–2,5 мкг / мл (никель). Погрешность измерения не более 25% (P = 0,95). Время одного определения 7–10 мин.

Хроническая интоксикация мышьяком и его неорганическими соединениями

Мышьяк и его неорганические соединения официально отнесены к канцерогенам при всех путях поступления в организм (МАИР, СанПиН 1.2.235–08, ГН 2.2.5.1313–03 и др.). В производственных условиях возможно заболевание раком легких при кумулятивном воздействии более 0,75 мг / м^3^ год. Концентрация As в воздухе при добыче руды, равная 0,028 мг / м^3^, является онкоопасной. Результаты эпидемиологических исследований, проведенных на производствах арсенита натрия, при получении содержащих мышьяк инсектицидов, при выплавке меди, показывают значительное повышение смертности от рака кожи, легких и лимфатических узлов.

При эколого-токсикологических исследованиях работами отечественных ученых доказано, что волосы также являются надежным индикатором воздействия на население *мышьяка, бромидов, фторидов, группы редкоземельных элементов и актиноидов* (вблизи производств по их переработке), что согласуется с данными зарубежных специалистов.

В нашей стране и за рубежом проведены многочисленные исследования, в которых продемонстрирована взаимосвязь между уровнем обеспеченности населения Zn, Se, Cu и другими микроэлементами и их содержанием в волосах, показана прямая зависимость концентрации Pb, Hg, As, Cd, Ni, Cr в волосах от уровня нагрузки популяции и индивидуума этими элементами. По мнению большинства авторов, анализ волос может использоваться в качестве оценки элементного статуса не только на популяционном, но и на индивидуальном уровне, отражая как эндогенное содержание элемента, так и уровень выведения элементов из организма.

При популяционных исследованиях в различных географических регионах были найдены значительные различия в изменении концентрации элементов в волосах. Так, например, при эпидемиологическом исследовании в Китае была выявлена зависимость между низкой концентрацией Se в волосах и эндемическим гипоселенозом.

Хроническая фтористая интоксикация

В экологических исследованиях и ранней диагностике *хронической фтористой интосикации* в качестве *биомаркеров воздействия* принято использовать содержание фторидов в моче, слюне, волосах и крови.

Наиболее часто проводят *определение фторидов в моче* с помощью ионоселективного электрода. Методика основана на определении разности потенциалов между анализируемым раствором мочи, к которой добавлен буферный раствор с высокой ионной силой, и внутренним раствором электрода. Величина разности потенциалов пропорциональна обратному логарифму активности фторидов в исследуемом растворе. Нижняя граница определения 5·10^–7^ моль / л (0,01 мг / л) фторида, систематическая погрешность 4%, воспроизводимость ±2%, интервал определяемых концентраций — от 5·10^–7^ до 10^–2^ моль / л. Время определения фторида в одной пробе мочи около 5–6 мин. Вещества, естественно содержащиеся в моче, определению не мешают. Методика может быть использована и для анализа других биологических материалов после их минерализации.

Заключение

Взаимоотношения человека с окружающей средой — одна из сложнейших проблем современного естествознания. Главная задача охраны природы — обеспечить установление равновесия между использованием и восстановлением ее ресурсов. Согласно данным литературы, в конце марта 2020 г., выбросы вредных веществ в Китае снизились на 25%, что можно связать с карантином при COVID-19: произошло улучшение качества воздуха из-за сокращения выброса оксида азота на 40% и на 10% – частиц (разнообразных веществ) диаметром 2,5 мкм и менее, которые поражают легкие и сердечно-сосудистую систему. В Финляндии, по данным финских специалистов, за время карантина снизилось число зарегистрированных случаев детской астмы – на 6 000, число госпитализаций из-за приступов астмы – на 1900, а количество случаев преждевременных родов – на 600.

Но, по мнению ряда экспертов, долгосрочного благоприятного эффекта не будет,так как в 2020–2021 гг. зафиксирован резкий рост потребления пластиковой упаковки в связи с карантином. По оценке Международного союза охраны природы, в океаны ежегодно попадает более 12 млн т пластика (примерно 3% массы производимых из него товаров). После карантина пластиковых отходов будет значительно больше. Пластик встраивается в пищевые цепочки: в мясе рыбы их концентрация составляет 3 частицы на 1 г, у ракообразных — 8, а у морских

моллюсков — до 9–10, и вновь пластик возвращается к человеку. Среднестатистический житель Земли ежегодно проглатывает с едой 40 000–60 000 микрочастиц пластика.

Экотоксикологи выдвигают гипотезу, что в итоге долгосрочные последствия пандемии будут иметь негативное влияние на окружающую среду. Но «научная гипотеза всегда выходит за пределы фактов, послуживших основой для ее построения», — говорил Владимир Иванович Вернадский. Негативные прогнозы могут и не сбыться, если каждый из нас — конкретным делом охраны окружающей среды, хотя бы в своем доме и рядом с ним, - откликнется на призыв Назыма Хикмета: «…так кто же здесь рассеет тьму?»

Экологический мониторинг основан на регулярном проведении определений большого числа образцов или единичных образцов, но содержащих несколько токсикантов.

Во многих странах имеются национальные программы охраны природы, учитывающие местную специфику. Как показывает практика, природоохранная деятельность быстро превращается из региональной в национальную, а затем и глобальную, успехи которой зависят от всего мирового сообщества.

Глава 10. Биологическая опасность и биологический терроризм

А царь тем ядом напитал
Свои послушливые стрелы
И с ними гибель разослал
К соседям в чуждые пределы.

Александр Сергеевич Пушкин (1799–1837),
величайший русский поэт,«солнце русской поэзии»,
основоположник современного русского литературного языка,
прозаик, драматург, историк, публицист, «наше всё»

Нет обороны, так склюют сороки и вороны.

Русская поговорка

10.1. Основные понятия

В 1975 г. вступил в силу основополагающий правовой документ в сфере нераспространения биологического оружия — *Конвенция о запрещении биологического и токсинного оружия* (КБТО). В отличие от других видов оружия массового уничтожения — ядерного и химического, которыми в настоящее время располагает ряд государств мира, участники КБТО обязались не разрабатывать, не производить, не накапливать, не приобретать и не передавать биологическое оружие. Два основополагающих правовых документа — КБТО и Конвенция о биологическом разнообразии (1992)В 1995 г. Российская Федерация ратифицировала Конвенцию о биологическом разнообразии и подписала Протокол о биологической безопасности, регулирующий обработку и межграничный перенос «любых живых измененных организмов, являющихся результатом использования биотехнологических методов и способных оказать неблагоприятное воздействие на сохранение и устойчивое использование биологического разнообразия организмов»., принятые мировым сообществом, должны были бы снизить угрозу глобальной биобезопасности. Однако этого не случилось, и человечество сегодня вплотную подошло к той грани, за которой случаи биологического террора реальны. Об этом свидетельствует обнаружение в ходе СВО (специальной военной операции) РФ в 2022 г. секретных биолабораторий США на Украине. К сожалению, 336 подобных опасных биолабораторий США расположны в 30 странах мира, в том числе в окружении России 50 из них. 20 августа 2022 г. ВСУ (вооруженные силы Украины) применили в Запорожской области против российских военных ботулотоксин В (см. ниже) в виде аэрозоля, распыленного с помощью БПЛА. РФ отправила соответствующий документ в Организацию по запрещению химического оружия (ОЗХО), свидетельствующий о биологическом терроризме Украины. Однако вопросы контроля за токсинами подпадают под действие биологического и токсинного оружия, а не химического. А в этой сфере отсутствуют механизмы контроля, так как организация, аналогичная ОЗХО, так и не была создана из-за противодействия США и Великобритании (2001). По сути, КБТО – соглашение, не имеющее средств мониторинга и контроля за его исполнением. В 1975 г. ботулотоксин А был принят на вооружение армии

США под шифром XR, а запасы его хранятся в арсенале Пайн-Блафф в штате Арканзас. На 2022 г. в арсенале Пентагона более 20 различных смертоносных токсинных агентов. В США запатентовали технические средства доставки и применения биооружия на основе беспилотника с контейнером для зараженных насекомых против живой силы врага без риска для американских военных. В сентябре 2022 г. в Женеве РФ представила на совещании государств — участников КБТО документы, подтверждающие несоблюдение США и Украиной обязательств по международному договору и нарушение ими статей 1 и 4 Конвенции по биооружию.

В перечне наименее контролируемых и наиболее опасных угроз человечеству подавляющее большинство экспертов называют *биоагрессию, биотерроризм* и *экологические войны*. Это заключение основывается как на уже свершившихся фактах террористических акций в США, Японии, Индии, Китае и ряде других стран, так и на достижениях в развитии биотехнологии, молекулярной биологии и медицины. По данным экспертов, 1990–2010 гг. — *период разработки агентов, мишенью действия которых послужили генные структуры клеток*. Особую опасность представляет группа эмерджентных инфекций вирусной природы, против которых отсутствуют эффективные терапевтические средства.

Ареалы обитания огромного числа возбудителей опасных инфекционных болезней хорошо известны. Рассматривать возбудителей инфекционных болезней в качестве исходного материала для разработки биологического оружия правомерно, но вероятность их использования без применения специальных технологий и оборудования (а оно уже появляется, см. выше) как биологического оружия массового уничтожения невелика. Однако такая вероятность стремительно растет. Как предостережение миру звучат сегодня слова известного американского астрофизика и биофизика Томаса Голда (1920–2004): «Микробы — вот кто правит миром».

Существуют *многочисленные природные токсины* и *биорегуляторы* (рицин, сакситоксин, тетродотоксин, батрахотоксин, аматоксин и др.), которые, как показывают реальные примеры их использования следует серьезно учитывать при системном подходе к биологической безопасности.

Биологическая опасностьТермины и определения даны согласно Справочнику по поражающему действию биологического оружия, 1995 г. и https://encyclopedia.mil.ru/encyclopedia/dictionary/details_2022 **— отрицательное воздействие биологических патогенов любого уровня и происхождения (от прионов до многоклеточных организмов), создающих опасность в медико-социальной, технологической, сельскохозяйственной и коммунальной сферах.**

Биологическая безопасность — состояние защищенности людей, сельскохозяйственных животных и растений, окружающей природной среды от опасностей, вызванных или вызываемых источником биолого-социальной чрезвычайной ситуации.

Биологический терроризм — использование опасных биологических агентов для нанесения ущерба жизни и здоровью людей ради достижения целей политического и материального характера.

Биорегуляторы — вещества биологического происхождения, существенно влияющие на протекающие в организме процессы.

Генетически модифицированные (сконструированные) организмы — микро- и макроорганизмы с искусственно измененным геномом, определяющим вариации свойств организма.

Источники биологической опасности — совокупность природных и техногенных биологических факторов, способных причинить существенный вред здоровью людей и животных вплоть до их гибели, а также ущерб обществу и экономике путем распространения опасных биологических агентов.

Обеспечение биологической безопасности — соблюдение правовых норм, выполнение санитарно-гигиенических и санитарно-эпидемиологических правил, технологических и организационно-технических требований, а также проведение соответствующего комплекса правовых, санитарно-гигиенических, санитарно-эпидемиологических, организационных и технических мероприятий, направленных на предотвращение, ослабление и ликвидацию заражения людей, сельскохозяйственных животных и растений инфекционными болезнями.

Экопатогены — совокупность факторов природного и техногенного происхождения, наносящих ущерб объектам окружающей среды.

Опасные биологические агенты — патогенные микроорганизмы, токсины и паразитические организмы, вызывающие заболевания человека, животных, растений, разрушение материалов, резкое ухудшение качества окружающей среды.

Бактериологическое (биологическое) оружие — специальные боеприпасы и боевые приборы со средствами доставки, снаряженные биологическими средствами, предназначенными для поражения живой силы противника, сельскохозяйственных животных, посевов сельскохозяйственных культур, а также порчи некоторых видов снаряжения и материалов.

Токсинное оружие — разновидность биологического оружия, поражающее действие которого основано на болезнетворных свойствах токсинов различного происхождения.

Токсины — высокотоксичные продукты микроорганизмов, природные яды животного или растительного происхождения либо их аналоги, полученные методами химического синтеза, белки, обладающие высокой биологической активностью и чрезвычайно токсичные для высших животных (рицин, дифтерийный токсин, ботулотоксин и т.д.).

Генетическое оружие — разновидность биологического оружия, поражающее действие которого основано на использовании свойств генетически модифицированных микроорганизмов или специально сконструированных молекул нуклеиновой кислоты.

В Центре контроля болезней США опасные биологические агенты подразделяют на три категории опасности: *A, B* и *C*.

Категория A — это высокоприоритетные агенты, представляющие риск для национальной безопасности (например, *Bacillus anthracis, Clostridium botulinum, Yersinia pestis, Variola major*). К категории *A* отнесены возбудители, способные передаваться от человека к человеку, вызывать высокую заболеваемость и смертность, провоцировать панику среди населения. Для инактивации биоагентов категории *A* требуются специальные средства защиты.

Категория B — это высокоприоритетные агенты (например, рицин, ε-токсин, энтеротоксины). Возбудители категории *B* вызывают заболевания с низким уровнем смертности и умеренной выраженностью остальных признаков.

Категория C — это наиболее приоритетные агенты — эмерджентные патогены, которые могут быть сконструированы и диссеминированы (например, хантавирусы, вирусы клещевого энцефалита). К категории *C* отнесены возбудители, которые могут быть применены в качестве оружия массового поражения после различных, в том числе и генно-инженерных, манипуляций в силу их высокой трансмиссивности и способности к воспроизводству и вызывающие высокую смертность.

Изучением природных ядов — токсинов — занимается самостоятельная наука *токсинология*. Однако, исходя из целей настоящего издания, далее будет дана краткая информация о метаболизме и методах аналитической диагностики природных токсинов.

Ядовитость — универсальное явление в живой природе. Среди животных и растительных организмов ядовитые формы встречаются практически во всех таксонах. Хорошо известна высокая токсичность бактериальных ядов.

10.2. Природные токсины: источники, классификация, токсические и фармакологические эффекты, методы определения

Язык и золото …вот наш кинжал и яд.

Михаил Юрьевич Лермонтов (1814–1841),
великий русский поэт,

прозаик, драматург, художник

Ты в кубок яду льешь.
а справедливость
Подносит этот яд к твоим губам.

Уильям Шекспир (1564–1616), великий английский
писатель, поэт и актер, один из лучших драматургов мира

Источниками токсинов могут быть и простые микроорганизмы, и сложно организованные позвоночные.

По *химической структуре* токсины весьма разнородны: это алифатические, ароматические и гетероциклические соединения, относящиеся к алкалоидам, стероидам, полипептидам и другим группам биологически активных веществ.

Действие токсинов может вызывать *острое* или *хроническое отравление*, поражая при этом едва ли не все системы организма.

Разнообразная клиническая картина отравлений, с одной стороны, и часто очень сложная, лабильная структура токсинов, с другой стороны, ограничивают возможности токсикологических и аналитических исследований при идентификации токсинов.

Многочисленные химические классы соединений, встречающиеся среди токсинов, позволяют рационально их систематизировать только *на основе биологической классификации.*

К организмам, продуцирующим токсины, относятся:

* бактерии; * грибы; * высшие растения; * беспозвоночные животные; * позвоночные животные.

Токсины бактериального происхождения

Среди множества токсинов, продуцируемых патогенными бактериями, внимание токсикологов-аналитиков привлечено к трем наиболее сильным бактериальным токсинам:

* тетанус-токсину; * токсину ботулизма; * веротоксину.

Токсин ботулизма и тетанус-токсин выделяются облигатными анаэробными бактериями рода *Clostridium* и относятся к нейропаралитическим ядам. Клостридиальные нейротоксины имеют белковую природу и являются сильнейшими из известных ядов.

Токсин ботулизма относится к «живым» ядам, в организм попадает с пищей, зараженной токсином *C. botulinum*. Его молекула состоит из четырех пептидов с молекулярной массой 150–900 кД. Полулетальная доза составляет 1 нг/кг массы. Самое опасное, и при этом незаметное, применение ботулотоксина в виде аэрозоля, так как он хорошо всасывается со слизистых глаза и верхних дыхательных путей.

Клиническая картина: диплопия, птоз с последующим ощущением слабости верхних, затем нижних конечностей; в тяжелых случаях развивается паралич дыхательных мышц. Специальных методов лечения ботулизма нет. Возможно применение антитоксина в течение первых часов отравления. Видимо, поэтому на Украину из Канады была доставлена большая партия антидота еще в 2019 г. *Аналитическое определение* токсина ботулизма требует его идентификации в крови или кале пациента. Для диагностических целей применяют чувствительный ИФА (технология ELISA, см. п. 5.2). Как способ детекции *бактериальных спор* и *токсинов* используют биосенсор, основанный на электрохемилюминесценции. Этот анализатор обладает чувствительностью, позволяющей обнаруживать *фемтограммы* токсинов.

Тетанус-токсин образуется в некротизированной ране при заражении спорами *C. tetani.* Молекула этого токсина состоит из двух пептидов, объединенных дисульфидной связью (50–100 кДа).

Особенно опасен неонатальный тетанус-токсин (летальность при заболевании составляет 24%). Вероятность летального исхода снижается при использовании антитоксина и внутривенном введении пенициллина. В настоящее время нет сведений о применяемых аналитических методах идентификации и количественного определения тетанус-токсина.

Один из штаммов широко распространенной кишечной палочки *Escherichia coli*, встречающийся обычно в кишечнике крупного рогатого скота и других животных, продуцирует сильный цитотоксин — *веротоксин* (*verotoxin*), или *вероцитотоксин* (*verocytotoxin*). Химическая природа веротоксина до сих пор не установлена. Веротоксинпродуцирующие штаммы *E. coli* определяют при помощи *полимеразной цепной реакции* (ПЦР), *ДНК-гибридизации* и *анализа цитотоксичности веротоксина*.

Прочие штаммы *E. coli*, а также и другие виды бактерий продуцируют дизентерийные токсины, которые способны вызывать отравление при употреблении зараженного мяса, не прошедшего достаточную тепловую обработку. Для детекции дизентерийного токсина в образцах кала больного и в зараженном мясе применяется ИФА.

Микотоксины

Микотоксины представляют собой группу потенциально токсичных веществ, выделяемых различными видами грибов. Только немногие виды грибов продуцируют токсины, вызывающие смерть при попадании внутрь. Значительно большее количество грибов, паразитирующих на пищевых продуктах, выделяют токсины, которые могут быть причиной нежелательных эффектов при хроническом попадании в организм в малых количествах.

Важную роль в диагностике отравлений играют *аналитические* токсикологические исследования.

Афлатоксины

Афлатоксикоз — отравление, вызванное употреблением пищи, загрязненной грибами рода *Aspergillus.* Афлатоксины B~1~, B~2~, G~1~ и G~2~ — группа микотоксинов, продуцируемых плесневыми грибами *A. flavus* и *A. parasiticus*, которые встречаются в пище человека и кормах животных (например, в кукурузе, арахисе, фисташках). *Механизм действия* микотоксинов заключается в том, что они после метаболической активации способны соединяться с пуриновыми основаниями, нарушая связи комплементарных пар оснований в двухцепочечной молекуле ДНК, и в результате угнетать репликацию и транскрипцию ДНК, а также индуцировать мутации (см. гл. 2). Афлатоксины — *потенциальные канцерогены*.

Афлатоксин B~1~ является наиболее токсичным. Его главный метаболит — афлатоксин M~1~ (рис. 10-1) обычно экскретируется из организма с мочой или грудным молоком при употреблении загрязненной грибами пищи. Другой продукт метаболизма афлатоксина B~1~, превращаясь в эпоксид, реагирует с ДНК и может провоцировать гепатоцеллюлярную карциному.

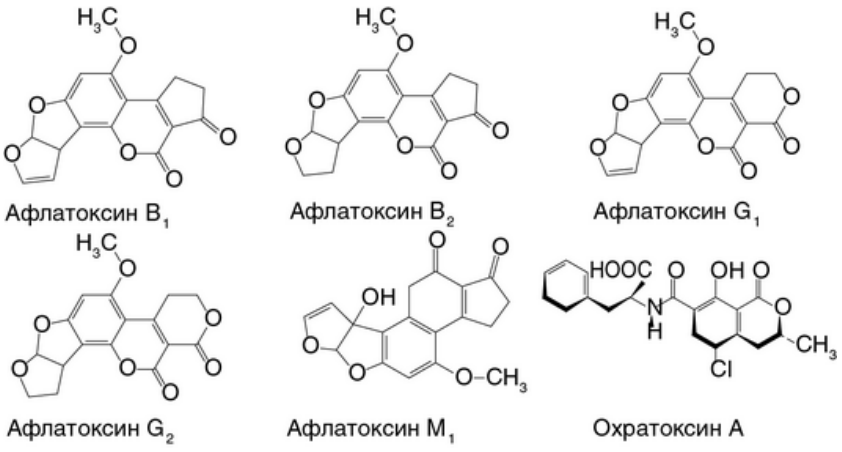


Рис. 10-1. Структурные формулы афлатоксинов и охратоксина А

Существует несколько аналитических методов определения в грудном молоке, моче и образцах крови афлатоксинов G~1~, G~2~, B~1~ и B~2~. Методом ТСХ афлатоксины разделяют на индивидуальные компоненты B~1~, B~2~, G~1~ и G~2~. При детектировании в УФ-свете первые два флуоресцируют синим цветом, вторые два —

зеленым. Описаны процедуры их определения при помощи высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ), ИФА, однако *предпочтительным методом* является ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией.

Охратоксин А — широко распространенный микотоксин, выделяемый грибами *A. ochraceus* и *Penicillinum verruculosum*, его можно обнаружить в зернах кофе, злаков, крупяных продуктах, специях и т.д. Кроме того, возможно заражение человека по пищевым цепям, например через потребление свинины. Охратоксин А (см. рис. 10-1) очень устойчив вследствие связывания с компонентами плазмы крови, *T~½~* составляет около 35 дней, является канцерогеном, тератогеном и иммунотоксичным агентом. *Механизм токсичности* заключается в увеличении уровня ПОЛ, ингибировании реакций алкилирования аминов и, возможно, превращении в метаболиты, способные образовывать аддукты ДНК (см. гл. 2). *Идентификацию и количественное определение* охратоксина А проводят с помощью ТСХ, ИФА, ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией при длине волны 330 нм, ВЭЖХ с масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС).

Деоксиниваленол, Т-2 токсин, зераленон

Среди других микотоксинов, представляющих опасность для человека, необходимо отметить микотоксины, продуцируемые плесневыми грибами рода *Fusarium*: *F. graminearum* (*Gibberella zeae*), *F. culmorum*, *F. sporotrichoides*, паразитирующими на зернах злаковых растений (кукуруза, пшеница). Основные симптомы отравления — тошнота, рвота, боль в животе, диарея, головокружение и головная боль — возникают через 5–30 мин после употребления в пищу покрытой плесенью пшеницы и кукурузы.

Деоксиниваленол (ДОН) представляет собой микотоксин, принадлежащий к типу трихотецена (*trichothecene*) и является модулятором иммунной системы (рис. 10-2). Ежедневная доза токсина, к которой человек толерантен, составляет 0,5 мкг / кг.

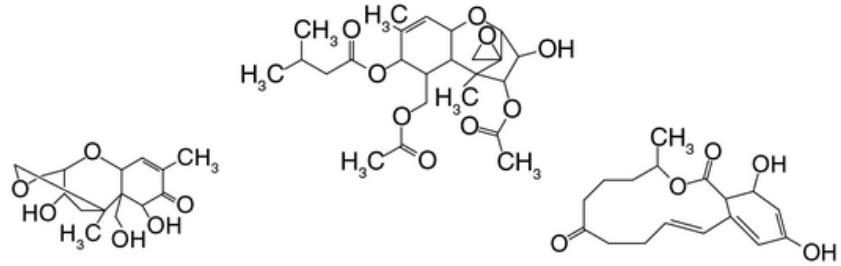


Рис. 10-2. Структурные формулы деоксиниваленола, зераленона и Т-2 токсина

Т-2-токсин (см. рис. 10-2) также представляет собой микотоксин, принадлежащий к типу трихотецена, и является потенциальным биологическим оружием, поскольку вызывает отравление под названием «алиментарная токсическая алейкия» с уровнем смертности более 50% (гиперемия слизистых оболочек, слабость, лихорадка, тошнота, рвота, гастроэнтериты, прогрессирующий лимфоцитоз, анемия).

Зераленон — производное бензоксациклотетрадецина, относится к числу наиболее распространенных микотоксинов (см. рис. 10-2). Из грибков *Gibberella zeae*, ранее называемых *Fusarium graminearum*, выделяют несколько изомеров этого токсина: *цис*-, *транс*-, D- и L-изомеры. Все они обладают *эстрогенной* и *анаболической активностью*. Этот токсин в последнее время активно используется в качестве *допингового* средства в спорте высших достижений.

Обычно через зараженное зерно человек подвергается воздействию сразу нескольких токсинов *Fusarium*, поэтому *большинство аналитических методик*, используемых для определения микотоксинов, проводится в одной процедуре. Для скрининга используют ТСХ. Большинство методик количественного определения основаны на использовании газовой хроматографии с электронозахватным детектором (ГХ-ЭЗД) и ВЭЖХ. В ГХ-МС пределы обнаружения для восьми различных микотоксинов, включая ДОН, Т-2 токсин и зераленон, лежат в интервале 0,1–0,5 мкг / кг, вероятность обнаружения составляет около 90%.

Эргоалкалоиды

Плесневые грибы *Claviceps purpurea* паразитируют на зернах злаков, чаще всего на ржи, во время дождливых сезонов и выделяют токсины, называемые эргоалкалоидами, которые, в свою очередь, вызывают заболевание эрготизм (диарея, рвота, гангрена; конвульсии, угнетение ЦНС или маниакальное возбуждение). В основе химического строения эргоалкалоидов лежит лизергиновая кислота. Известно 12 основных алкалоидов этой группы. *Рекомендуемыми методами* определения эргоалкалоидов в сыворотке крови является ВЭЖХ с флуоресцентной или масс-селективной детекцией после твердо-жидкостной экстракции. При исследовании мочи методами выбора является ТСХ и ГХ-МС.

Токсины галлюциногенных грибов (см. п. 6.3.5)

Токсины Amanita phalloides (бледная поганка, «ангел смерти») и их аналоги

В большинстве стран грибы рода *Amanita* и *Galerina*, которые образуют *аманитиновый токсин* и *фаллотоксин*, являются основными причинами отравлений грибами. Токсины *A. phalloides* и родственного *Agaricales* относятся к наиболее ядовитым, вызывающим летальный исход природным веществам со смертельной дозой 0,1–0,3 мг / кг.

Токсическое действие проявляют циклические полипептиды (рис. 10-3): фаллотоксины (бициклические гептапептиды), виротоксины (моноциклические гептапептиды) и аматоксины (бициклические октапептиды).

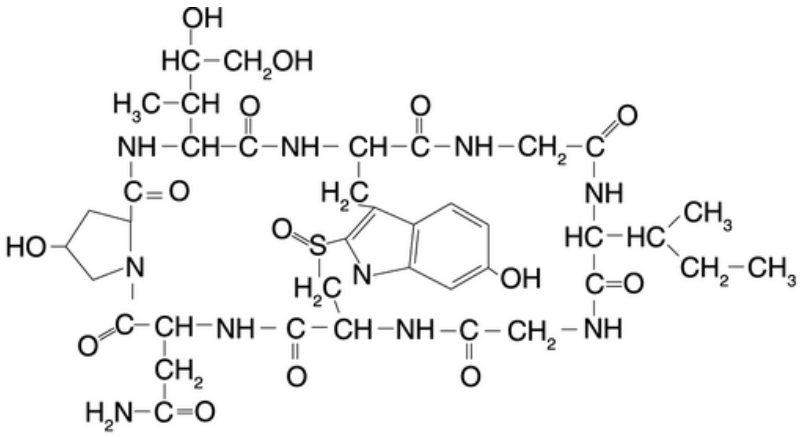


Рис. 10-3. Структурная формула α-аманитина

Фаллотоксины разрушают органеллы клетки за счет лизиса митохондрий и высвобождения ферментов, стимулируют полимеризацию *G*-актинов, усиливают потерю клетками ионов Ca^2+^ и K^+^, в плазме крови необратимо взаимодействуют с белками, поражают печень.

Аматоксины необратимо ингибируют РНК-полимеразу II. Отравление бледной поганкой можно условно разделить на три фазы. Первая начинается спустя 6 ч после употребления грибов и характеризуется лихорадкой и холероподобной диареей. Она объясняется действием фаллоидинов и успешно лечится восстановлением электролитного баланса крови. Вторая фаза наступает спустя 2–3 дня в виде кратковременной ремиссии, которая является ложной, затем она сменяется еще более опасной третьей фазой, характеризующейся гепаторенальными симптомами, вызванными действием аматоксинов на РНК-полимеразу. Повреждение печени происходит за счет увеличения активности аминотрансферазы в плазме. *Отравления аматоксинами смертельны*.

α- и β-Аманитины — целевые вещества при исследовании биообъектов при отравлении бледной поганкой. В каждом грамме сырых грибов бледной поганки содержится 0,08 мг α-аманитина и 0,05 мг β-аманитина, всего 0,13 мг. *Смертельная доза α-аманитина* для человека составляет 5–8 мг (перорально). *Ни один из предложенных антидотов не дал положительных результатов*, поскольку гепаторенальные симптомы проявляются только после необратимого связывания токсинов соответствующим ферментом.

Сложная химическая структура и низкая концентрация в плазме затрудняют идентификацию токсинов в крови. Предел обнаружения β-аманитина методом ИФА равен примерно 80 пг / мл, методом ВЭЖХ с электрохимическим детектором — 2 мкг / л, ВЭЖХ-МС (для α- и β-аманитина) — 10 мкг / л.

Гирометрин

Гирометрин содержится в ложных сморчках и в процессе их жизнедеятельности гидролизуется в монометилгидразин — хорошо известное высокотоксичное ракетное топливо. Отравления с летальным исходом после употребления этих грибов составляют от 2 до 4% общего количества отравлений грибами в Европе.

Монометилгидразин — прозрачная жидкость с характерным запахом органических аминов, смешивается с водой, гидразином, спиртами, растворим в углеводородах, слабое основание, мощный восстановитель, возгорается при контакте с окислителями. Симптомы отравления ложными сморчками напоминают отравление бледной поганкой *Amanita*. Исследование биообъектов проводят методом парофазного анализа-ГХ с ПИД.

Коприн

Коприн — аминокислота, близкая глутаминовой, содержится в «чернильных» грибах рода *Coprinus*, неядовита до момента приема алкоголя.

Фитотоксины

К токсинам, продуцируемым растениями, относятся рицин, конин, цикутоксин, фурокумарины, псоралены, β-N-оксалиламино-L-аланин, циказин, дигоксин и дигитоксин.

Зоотоксины

Многие зоотоксины обладают высокой токсичностью и представляют реальную опасность для человека и животных (табл. 10-1).

Таблица 10-1. Сравнительная токсичность некоторых широко известных зоотоксинов

Токсин и его источник	***LD*~50~ (мыши), мг / кг**
Нейротоксин кобры	0,075
Нейротоксин скорпиона	0,009
Сакситоксин (из динофлагеллат)	0,008
Тетродотоксин (из рыбы фугу)	0,008
Батрахотоксин (кожный яд амфибий)	0,002

Примечание. Для сравнения: зоман (боевое отравляющее вещество) — *LD*~50~ 0,1 мг / кг; мускарин (алкалоид мухоморов) — *LD*~50 ~1 мг / кг; цианид калия — *LD*~50 ~10 мг / кг.

В этом разделе обсуждаются только некоторые из зоотоксинов, имеющие клинико-токсикологическое и криминалистическое значение. Токсинологическая классификация ядовитых животных представлена на рис. 10-4. *Первично-ядовитые* животные вырабатывают ядовитый секрет в специальных железах, различаются по способам выработки и применения яда. *Вторично-ядовитые* животные используют яды других организмов (например, насекомые, обитающие на ядовитых растениях).

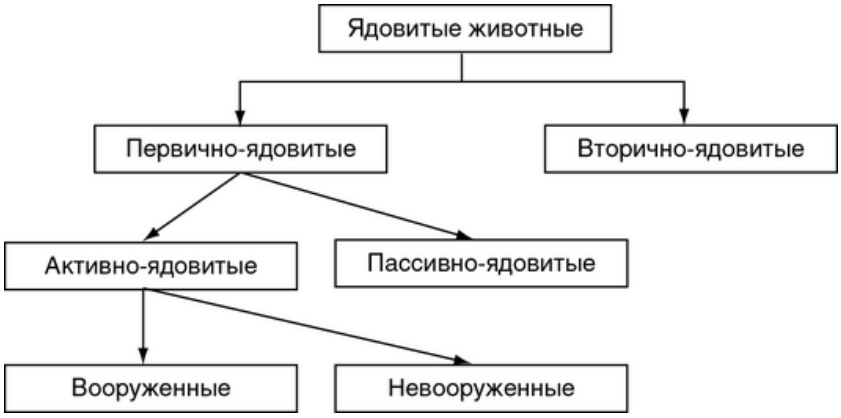


Рис. 10-4. Токсинологическая классификация ядовитых животных

Активно-ядовитые животные имеют специальный аппарат, который у *вооруженных* животных снабжен ранящим устройством (зубы у змей, жало у насекомых, колючки у рыб). *Невооруженные* животные лишены ранящего приспособления (кожные железы амфибий) и оказывают токсическое действие при трансдермальном контакте.

Пассивно-ядовитые животные накапливают ядовитые продукты метаболизма в различных органах и тканях и представляют опасность только при попадании в пищеварительный тракт другого организма.

Действие зоотоксинов может быть *местным* (в месте его первичного воздействия) или *резорбтивным.*

В зависимости от химической природы ядов местное действие бывает очень сильным, в тяжелых случаях приводящим к некрозу пораженной ткани (яды кишечнополостных, гадюк, жалоносных перепончатокрылых), но возможно и преобладание общих симптомов отравления после всасывания яда из первичного депо (яд каракурта).

Токсины характеризуются высокой *специфичностью действия*. Так, нейротоксины змей нарушают передачу возбуждения в нервно-мышечных синапсах, токсины амфибий (батрахотоксин), рыб (тетродотоксин), простейших (сакситоксин) блокируют распространение нервного импульса, ферменты ядов гадюк воздействуют на свертывающую систему крови.

Фикотоксины

Отравление моллюсками, вызванное фикотоксинамиФикотоксины — токсины водорослевого происхождения., обычно проявляется у человека:

* паралитической интоксикацией (сакситоксины); * диарейной интоксикацией (например, окадаиновая кислота); * нейротоксическим действием (бревеетоксин); * амнестической интоксикацией (домоевая кислота).

Конотоксин улиток

Известны уколы радулярным зубом, находящимся в хоботе у некоторых видов улиток рода *Conus*, вызывающие смерть человека. Есть мнение, что существует до 50 000 конотоксинов, содержащихся в различных видах рода *Conus*.

Токсины книдарий

Палитоксин — один из самых сильных деполяризующих агентов. Он вызывает сокращение гладкой мускулатуры в концентрации 10^–10^ г / мл. При отравлении этим токсином используют защитное действие кортикостероидов и кальцийзависимый эффект палитоксина.

Токсины медуз весьма сложны по своей природе и разнонаправлены по действию. Для выделения, очистки и идентификации ядов книдарий используют метод КЭФ и ИФА.

В токсикологии ядов достаточно хорошо изучены и другие группы токсинов:

* головоногих и брюхоногих моллюсков (мурексин, сенециоилхолин, акрилихолин, цефалотоксин, макулотоксин); * арахнид и гименоптер (нейротоксины полипептидной природы: α-латротоксин, робустотоксин, версутоксин и др.); * насекомых (мандаротоксин, мелиттин, соленопсин А, дендролазин, иридомирмецин, кантаридин); * многоножек (манделонитрил); * иглокожих (астеросапонины А и В, тритерпеновые гликозиды и др.); * рыб (тетродотоксин, сигуатоксин, маитотоксин и др.); * амфибий (самандарин, батрахотоксин, буфотоксин, буфотенин, буфогенин); * рептилий.

Информация об указанных группах токсинов широко представлена на электронном приложении к первому изданию учебника 2010 г. и учебном пособии 2008 г. (см. рекомендуемую литературу).

Заключение

«Образование — это оружие, эффект которого зависит от того, кто его держит в руках, кого этим оружием хотят ударить» — слова И.В. Сталина, сказанные в 1934 г. в беседе с английским писателем Г. Уэллсом, звучат сегодня

очень актуально. Технологическая революция не только дает человеку блага, но и значительно увеличивает потенциальные угрозы, например использование научных достижений террористическими организациями для противозаконной деятельности. Задача создания глобальной системы надзора за использованием биологического и токсинного оружия несопоставимо сложнее, чем за использованием химических агентов. В настоящее время растет сеть региональных центров и лабораторий (с высоким уровнем биологической защиты) для детектирования агентов, могущих служить или уже послуживших причиной биотеррористических актов, и для выработки ответных мер. Выявление рецепторных мишеней токсикантов (во многих случаях уже известных), токсинов или биоактивных компонентов вирусов в белках хозяина, разработка методов аналитической диагностики и поиск путей оптимальной защиты организма — важнейшие задачи современной токсикологии при несомненном применении новейших технологий токсикологической химии.

Эпилог

Источник знаний неистощим:
какие успехи ни приобретай
человечество на этом пути,
все людям будет оставаться
искать, открывать и познавать.

Гончаров Иван Александрович (1812–1891).
известный русский писатель, литературный
критик, член-корреспондент Петербургской АН
по разряду русского языка и словесности

Аналитическая токсикология, или токсикологическая химия, — наука меж- и полидисциплинарная по своей сути.

Профессиональные эксперты в области развития науки прогнозируют, что в аналитической токсикологии в самое ближайшее время будут широко использоваться достижения нанотехнологии, геномики, информационных технологий и др. Диагностические микрочипы и искусственный интеллект обеспечат быстрый и одновременный анализ многих тысяч параметров, что крайне важно для определения токсикантов, экотоксикантов или токсинов в организме человека, животных и окружающей среде в режиме on-line. Однако всегда будут востребованы хорошо и глубоко образованные специалисты, но, как известно, «научить нельзя, можно только научиться».

Список основных сокращений

ААС — атомно-абсорбционная спектрометрия (пламенная)

АМФ — аденозинмонофосфат

АТФ — аденозинтрифосфат

АФД — азотно-фосфорный детектор

АФК (ROS) — активные формы кислорода

АХ — ацетилхолин

БДУ — биологически допустимый уровень

БОФ — белки острой фазы

БТШ (HSP) — белки теплового шока

ВАДА (WADA) — Всемирное антидопинговое агентство

ВОЗ (WHO) — Всемирная организация здравоохранения

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием

ВЭЖХ-УФ — высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием

ГАМК — гамма-аминомасляная кислота

ГЖХ — газожидкостная хроматография

ГРС — гамма-резонансная спектрометрия

ГСО — государственные стандартные образцы

ГХ — газовая хроматография

ГХ-МС — газовая хроматография с масс-селективным (масс-спектрометрическим) детектированием

ГХЦГ — гексахлороциклогексан

ДДТ — дихлордифенилтрихлорэтан

ДМД — диодно-матричный детектор

ДМТ — диметилтриптамин

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ДРС — динамическая реакционная система

ДЭ — диоксиновый эквивалент

ЕС — Европейский союз

ЖЖЭ — жидкость-жидкостная экстракция

ЖКТ — желудочно-кишечный тракт

ЖХ — жидкостная хроматография

ИБ — индекс безопасности

ИД — иммунодиффузии 231

ИКС — инфракрасная спектрометрия

ИЛ (IL) — интерлейкины

ИОНЗС — ингибитор обратного нейронального захвата серотонина

ИОХ — ионообменная хроматография

ИСП — индуктивно-связанная плазма

ИСП-МС (ICP-MS) — масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

ИСП-ОЭС — оптическая эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

ИСЭ — ионоселективный электрод

ИТФ — изотахофорез

ИФА — иммуноферментный анализ

ИХА — иммунохроматографический анализ

ИХМ — иммунохимический метод

ИЮПАК — Международный союз теоретической и прикладной химии (IUPAC)

КБТО — Конвенция о запрещении биологического и токсинного оружия

КГЭ — капиллярный гель-электрофорез

КЕГГ (КЭГГ, KEGG) — Киотская энциклопедия генов и геномов

КЗЭ — капиллярный зонный электрофорез

КП — карбаматы, использующиеся в качестве пестицидов

КР — комбинационное рассеяние

КРС — спектрометрия комбинационного рассеяния

КТА — клинико-токсикологический анализ

КУ — критический уровень

КЭ (КЭФ) — капиллярный электрофорез

КЭФ-МС — капиллярный электрофорез с масс-селективным детектированием

КЭХ — капиллярная электрохроматография

ЛСД — диэтиламид лизергиновой кислоты

МДА — метилендиоксиамфетамин

МДМА — метилендиоксиметамфетамин

МДУ — максимально допустимый уровень

МИД — методы искусственной детоксикации

МКБ-10 — Международная классификация болезней 10-го пересмотра

МЛГ — металлолигандный гомеостаз

МНПВО — многократно нарушенное полное внутреннее отражение

МС (MS) — масс-спектрометрия (или масс-спектр)

МС-МС (MS-MS) — тандемная масс-спектрометрия

МЭ — микроволновая экстракция

МЭКХ — мицеллярная электрокинетическая хроматография

НАА — нейтронно-активационный анализ

НАД^+^ — никотинамидадениндинуклеотид, окисленная форма

НАДН — никотинамидадениндинуклеотид, восстановленная форма

НАДФ^+^ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат, окисленная форма

НАДФН — никотинамидадениндинуклеотидфосфат, восстановленная форма

НКП (GCP) — надлежащая клиническая практика

НЛП (GLP) — надлежащая лабораторная практика

НПВО — нарушенное полное внутреннее отражение

НПП (GMP) — надлежащая производственная практика

НПР — нежелательная побочная реакция

НЦЭСМП — Научный центр экспертизы средств медицинского применения Росздравнадзора

ОМУ — оружие массового уничтожения

ООН — Организация Объединенных Наций

ОСО — отраслевые стандартные образцы

ПДК — предельно допустимая концентрация

ПИА — проточно-инжекционный анализ

ПИД — пламенно-ионизационный детектор

ПККН — Постоянный комитет по контролю наркотиков РФ

ПКО — предел количественного определения

ПО — предел обнаружения

ПОЛ — пероксидное окисление липидов

ПФИА — поляризационный флуоресцентный иммуноанализ

ПХБ — полихлорированные бифенилы

ПЦР — полимеразная цепная реакция

РБК — расчетный безопасный курс (применения препарата в клинике)

РИА — радиоиммунный анализ

РКС — резонансная рамановская спектрометрия

РКЭ — ртутный капающий электрод

РНК — рибонуклеиновая кислота

РФА — рентгенофлуоресцентный анализ

СанПиН — санитарные правила и нормы

СЖЭ — суперкритическая жидкостная экстракция

СОЗ — стойкий органический загрязнитель

СОП — стандартные образцы предприятий

ССТ — система сигнальной трансдукции

СХА — судебно-химический анализ

ТГК — тетрагидроканнабинол

ТИД — термоионный детектор, или ДТИ — детектор термоионный

ТСХ — тонкослойная хроматография

ТТ — теоретическая тарелка

ТФМЭ — твердофазная микроэкстракция

ТФЭ — твердофазная экстракция

УВИ — ультрафиолетово-видимый

УНП ООН — Управление по наркотикам и преступности ООН

УФ — ультрафиолетовый

ФНО-α (TNF-α) — фактор некроза опухолей

ФОП — фосфорорганические пестициды

ФОС — фосфорорганические соединения

ХЛ — хемилюминесценция

ХОП — хлорсодержащие пестициды

ХТА — химико-токсикологический анализ

ХТЛ — химико-токсикологическая лаборатория

ХЭ — холинэстэстераза

ЦНС — центральная нервная система

ЭЗД — электронно-захватный детектор, или ДЭЗ-детектор электронного захвата

ЭМ — эндогенные маркеры

ЭОП — электроосмотический поток

ЭТААС — атомно-абсорбционная спектрометрия с электро-термической атомизацией

ЯМР (NMR) — ядерно-магнитный резонанс

APCI — химическая ионизация при атмосферном давлении

BSTFA — бис (триметилсилил) трифтороацетамид

CDER — Центр по оценке и изучению лекарств в США (Center for Drug Evaluation and Research)

CI — химическая ионизация

CoA — кофермент А CoQ кофермент Q; Q — кофермент Q окисленный (убихинон); QH2 — кофермент Q восстановленный (убихинол)

COSY — корреляционная спектроскопия (correlated spectroscopy)

DAD — диодная матрица

DBI — ингибитор связывания диазепама (diazepam binding inhibitor)

DEP — прямое испарение (Direct Exposure Probe)

DFF — фактор фрагментации ДНК

DIP — прямой ввод (Direct Insertion Probe)

DMT1 — переносчик двухвалентных металлов

EGF — эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor)

EI — ионизация электронным ударом

EMEA — Европейское агентство по оценке лекарств (European Medicines Evaluation Agency)

EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique) — способ, основанный на связи с ферментами

ENFSI — Европейская сеть судебно-экспертных учреждений

EPA — Агентство по охране окружающей среды США

ESI — электроспрейная ионизация (электрораспыление)

FSD — быстросканирующие УФ-детекторы

FSOT — кварцевые колонки (fused silica open tabular column)

FTIR — ИК-Фурье-спектрометрия

GSH — глутатион восстановленный

GSSH — глутатион окисленный

GST — глутатион-S-трансфераза

Ig — иммуноглобулины (A, D, E, G, M)

IkB — белковый фактор

IRE — железочувствительный элемент

LIF — лазер-индуцируемая флуоресценция

LIMS — лабораторные информационные системы

MALDI — ионизация лазерной десорбцией при содействии матрицы

MAP — белки, ассоциированные с микротрубочками

MAPK — митогенактивируемая протеинкиназа

MPT — нарушение проницаемости митохондриальных мембран (mitochondrial permeability transition)

NAT — ариламин-N-ацетилтрансфераза

NIDA — Национальный институт лекарственной зависимости США

NOESY — ядерный эффект Оверхаузера (nuclear overhauser effect spectroscopy)

PARP — поли (АДФ-рибозо) полимераза

PHU — Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации фармацевтических продуктов, предназначенных для применения человеком (Pharmaceuticals for Human Use)

PLOT — обозначение хроматографических колонок, внутри которых помещается адсорбент с зернами определенного диаметра, закрепленными на внутренней поверхности капилляра (particle loaded open tabular

column)

PSUR’s — периодические обновляемые отчеты о безопасности ЛС (Periodic safety update reports)

PTV — программирование температуры испарения

Raf — внутриклеточная серин-треониновая протеинкиназа (белок p74c-raf)

Ras — класс мономерных регуляторных трансмембранных G-белков, состоящих из одной субъединицы (белок, связывающий гуаниновые нуклеотиды)

R~f~ — параметр ТСХ, отношение расстояния, пройденного веществом, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя

SAM — S-аденозилметионин

SIM — мониторинг селективных ионов

SNP — однонуклеотидные позиции в геномной ДНК, для которых в некоторой популяции имеются различные варианты последовательностей (аллели)

SULT — сульфотрансфераза

TFR — трансферриновый рецептор

TFs — факторы транскрипции

TGF-α, -β — (α/β)-трансформирующий ростовой фактор

ToF — времяпролетный масс-анализатор

US FDA — Агентство по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США

WCOT — капиллярные хроматографические колонки (wall coated open tabular column)

Список литературы

Барановская В.С. Методика поляризационного флуоресцентного иммуноанализа для определения дибутилфталата в воде / В.С. Барановская, А.Н. Берлина, С.А. Еремин // Журнал аналитической химии. № 77(4). С. 384–390 (2022). DOI: 10.31857/S004445022204003X.

Введение в молекулярную диагностику / под ред. акад. М.А. Пальцева. В 2 кн. — М.: Медицина, 2011. — ч. 1. 368 с. ил., ч. 2. 504 с., ил.

Винарский В.А. Масс-спектрометрия и хромато-масс-спектральный анализ / В.А. Винарский, Р.А., Юрченко, А.Е Коваленко, В.Ю. Кузовлев, В.В. Гладырев. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2013. – 143 с.

Григорьев А.М. Установление факта приема синтетического каннабиноида JWH-018 хромато-масс-спектрометрическими методами / А.М. Григорьев, С.А. Савчук, А.А. Мельник и др. // Журнал аналитической химии. 2012. – Т. 67. № 11 – С. 967–1042.

Другов Ю. С. Пробоподготовка в экологическом анализе / Ю.С. Другов, А.А. Родин. 6-е изд.— М.: Лаборатория знаний, 2020. — 858 с.

Ерощенко Н.Н. Разработка и валидация методики определения этилглюкуронида и этилсульфата как маркеров прижизненного употребления этилового спирта / Н.Н. Ерощенко, С.С. Барсегян, А.Н. Кирюшин и др. // Судебно-медицинская экспертиза. 2018. — № 4. — С. 42–47.

Калетин Г.И. Однонаправленность нарушения элементного статуса у рабочих, контактирующих с соединениями мышьяка, и лиц, страдающих онкологическими заболеваниями / Г.И. Калетин, Н.И. Калетина, Н.А. Павловская, А.В. Скальный // Медицина труда и промышленная экология. 2009. — № 10. — С. 12–22.

Киричек А.В. Комплексное исследование в вещественных доказательствах распространенных синтетических каннабиноидов, в том числе вещества АКВ-48 / А.В. Киричек, А.Э. Шабалина, В.С. Суракова и др. // Бутлеровские сообщения. 2012. – Т. 32. № 11. — С. 117–123.

Клиника, диагностика, лечение, судебно-медицинская экспертиза отравлений алкоголем и его суррогатами: практическое пособие / под ред. Е.Ю. Бонитенко. — СПб.: Медкнига «ЭЛБИ-СПб», 2013. — 636 с.

Куценко С. А. Основы токсикологии / С.А. Куценко. — СПб.: Фолиант, 2004. — 720 с.

Лошадкин Н.А. Военная токсикология: учебник / Н.А. Лошадкин, Б.А. Курляндский, Г.В. Беженарь, Л.В. Дарьина. — М.: Медицина, 2006. — 208 с.

Лужников Е.А. Медицинская токсикология: национальное руководство / Е.А. Лужников. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. — 928 с.

Майбурова А.В. Химико-токсикологическое исследование пиразидола / А.В. Майбурова, А.В. Киричек, А.Э. Шабалина, А.Е. Петухов // Вестник судебной медицины. 2018. — № 2. Т. 7 (69). С.23–29.

Мальцева Л.Н. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ для количественного определения органических соединений / Мальцева Л.Н., Мухаметова Л.И., Еремин С.А. // Лаборатория и производство. 2020. № 6 (15). С. 78–86. DOI: 10.32757/2619-0923.2020.6.15.78.86.

Медянцева Э.П. Определение амитриптилина методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа / Э.П. Медянцева, Э.Р. Газизуллина, Д.В. Брусницын и др. // Журнал аналитической химии. 2022. Т. 77. № 9. С. 828–836. DOI: 10.31857/S0044450222070088.

Общая токсикология / под ред. проф. Б.А. Курляндского, проф. В.А. Филова. — М.: Медицина, 2002. — 608 с.

Орбелис Д. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных / Харланд Б., Скальный А.; под ред. проф. А.В. Скального. — СПб: Наука, 2008. — 543 с.

Органическая химия: учебник / под ред. проф. Н.А. Тюкавкиной. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. — 640 с.

Пальцев М.А. Межклеточные взаимодействия / М.А. Пальцев, А.А. Иванов, Е.С. Северин. — М.: Медицина, 2003. — 287 с.

Руденко Б.А. Химико-аналитическое определение наркотических и допинговых средств / Б.А. Руденко, А.Е. Коваленко, К.А. Галузин и др. — М.: Нарконет, 2007. — 368 с.

Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общей ред. чл.-корр. РАМН проф. Р.У. Хабриева. — М.: Медицина, 2005. — 832 с.

Савчук С.А. Быстрая ВЭЖХ-МС/МС скрининговая методика определения в моче человека запрещенных наркотических средств, включая новые психоактивные вещества, а также их метаболиты / С.А. Савчук, К.М. Шестакова, Л.Н. Ризванова и др.// Судебно-медицинская экспертиза. 2020. – № 63(2). С. 32–40.

Савчук С.А. Определение маркеров синтетических каннабимиметиков PB-22, PB-22F, AB-PINACA, AB-FUBINACA в волосах и моче методом ГХ-МС/ С.А. Савчук, М.А. Гофенберг, Н.М. Никитина, А.В. Надеждин, Е.Ю. Тетенова // Наркология. 2013. — № 11 (143). — С. 66.

Савчук С.А. Химия и токсикология этилового спирта и напитков, изготовленных на его основе. Хроматографический анализ спиртных напитков / С.А. Савчук, В.П. Нужный, В.В. Рожанец. – М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2010. – 181 с.

Савчук С.А. Хромато-масс-спектрометрический анализ в наркологической практике / С.А. Савчук, А.М. Григорьев – М.: ЛЕНАНД, 2013. – 224 с.

Сергеев П.В. Рецепторы физиологически активных веществ / П.В. Сергеев, Н.Л. Шимановский, В.И. Петров. — М., Волгоград: Семь ветров, 1999. — 640 с.

Симонов Е.А. Наркотики: методы анализа на коже, в ее придатках и выделениях / Е.А. Симонов, Б.Н. Изотов, А.В. Фесенко. — М.: Анахарсис, 2000. — 128 с.

Симонов Е.А. Наркотические средства и психотропные вещества, контролируемые на территории РФ / Е.А. Симонов, Л.Ф. Найденова, С.А. Ворнаков; под ред. В.В. Рогозина. — М., 2003. — 411 с.

Софронов Г.А. Экстремальная токсикология: учебник / Г.А.Софронов, М.В. Александров, А.И. Головко и др.; под ред. Г.А. Софронова, М.В. Александрова. — СПб.: Медкнига «ЭЛБИ-СПб», 2016. — 2 изд.исправ. — 256 с.

Супотницкий М.В. Биологическая война. Введение в эпидемиологию искусственных эпидемических процессов и биологических поражений / М.В. Супотницкий — М.: Русская панорама, 2013. — 1136 с.

Супотницкий М.В. Микроорганизмы, токсины и эпидемии / М.В. Супотницкий. — М.: Вузовская книга, 2015. — 376 с.

Супрунчук А.А. Химико-токсикологическое исследование амитриптилина в моче / А.А. Супрунчук, А.В. Киричек, А.Э. Шабалина, А.Е. Петухов // Бутлеровские сообщения. 2017. — Т. 51, № 7. — С. 81–85.

Сыроешкин А.В. Токсикологическая химия: учебник / А.В. Сыроешкин, Плетенева Т.В., Левицкая О.В.; под ред. проф. Сыроешкина А.В. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2022. —512 с.

Токсикологическая химия. Аналитическая токсикология: учебник / под ред. Р.У. Хабриева, Н.И. Калетиной. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 747 с. С электронным приложением на CD.

Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов: Учебное пособие / под ред. проф. Н.И. Калетиной. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 1016 с. С электронным приложением на CD.

Токсикологическая химия. Т. 16.: учебник / Под ред. проф. Н.И. Калетиной, Е.А. Симонова. — М.: Издательский дом «Русский врач», 2005. — DVD.

Токсикологическая химия. Ситуационные задачи и упражнения /под ред. проф. Н.И. Калетиной. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. — 351 с.

ТСХ-скрининг токсикологически значимых соединений, изолируемых экстракцией и сорбцией: учебное пособие / [Раменская Г.В. и др.]; под. ред. А.П. Арзамасцева. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 239 с.

Харитонов Ю.Я. Аналитическая химия. Аналитика 1 и Аналитика 2: учебник / Ю.Я. Харитонов, В.Ю. Григорьева, И.И. Краснюк(мл.). — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2022. — 688 с. и 656 с.

Шабалина А.Э. Исследование компонентов курительных смесей, содержащих синтетические каннабимиметики RCS-4, JWH-250, CP 47, 497-C8 / А.Э. Шабалина, А.В. Киричек, Н.И. Калетина, В.А. Вандышев // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2012. — № 9. — С. 67–72.

Шабанов П.Д. Наркология / П.Д. Шабанов. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. — 832 с.

Шевырин В.А. Синтетические каннабиноиды в качестве новых психоактивных соединений. Установление структур, аналитические характеристики, методы определения и идентификация в объектах анализа наркотических средств / В.А Шевырин — М.: Перо, 2015. – 607 с.

Шигеев В.Б., Шигеев С.В. Обновленный учет причин смерти, связанных с немедицинским употреблением опиатов. — Методические рекомендации № 28. — Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения г. Москвы, 2019. — 44 с.

Элленхорн М.Дж. Медицинская токсикология: диагностика и лечение отравлений у человека. В 2 т. / М.Дж. Элленхорн; пер. с англ. — М.: Медицина, 2003. — Т. 1. — 1048 с.; Т. 2 — 1044 с.

Appolonova, S.A., Palacio, C., Shestakova, K.M. et al. (2020). In vivo and in vitro metabolism of the novel synthetic cannabinoid 5F-APINAC. Forensic Toxicology, 38(1). P. 160–171.

Baselt R.C. The Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. — Foster City, CA: Biomedical publication, 2009. — 1720 p.

Bjørklund, G., Aaseth, J., Ajsuvakova, O.P. et al. (2017). Molecular interaction between mercury and selenium in neurotoxicity. Coordination Chemistry Reviews, 332, 30–37.

Bondy, S.C. (2021). Metal toxicity and neuroinflammation. Current Opinion in Toxicology, 26, 8–13.

Chen, Q.Y., DesMarais, T., Costa, M. (2019). Metals and Mechanisms of Carcinogenesis. Annual review of pharmacology and toxicology, 59, 537–554.

Clarke's analysis of drugs and poisons/Edited by A. C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop; 4rd ed. — London: Pharmaceutical Press, 2011, 2 v. (XXI, 3–564, VIII, 567–1935, llXXXIV p.).

Handbook on the Toxicology of Metals/Ed.G. Nordberg et al., 3rd ed. — N. Y.: Academic Press, 2005. — 969 p.

Lippi, G., & Mattiuzzi, C. (2017). Misuse of the metabolic modulator meldonium in sports. Journal of sport and health science, 6(1), 49.

Markin, P.A., Brito, A., Moskaleva, N.E. et al. (2021). Short-and long-term exposures of the synthetic cannabinoid 5F-APINAC induce metabolomic alterations associated with neurotransmitter systems and embryotoxicity confirmed by teratogenicity in zebrafish. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 243, 109000.

Patwa, J., Flora, S. (2020). Heavy Metal-Induced Cerebral Small Vessel Disease: Insights into Molecular Mechanisms and Possible Reversal Strategies. International journal of molecular sciences, 21(11), 3862.

Skalny, A.V., Aschner, M., Sekacheva, M.I. et al. (2022). Mercury and cancer: Where are we now after two decades of research?. Food and chemical toxicology, 164, 113001. https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113001

Schumacher Y.O., Saugy M., Pottgiesser T., Robinson N. Detection of EPO doping and blood doping: the haematological module of the Athlete Biological Passport. Drug Test Anal. 2012 Nov;4(11):846-53. doi: 10.1002/dta.406. Epub 2012 Feb 28. PMID: 22374784.

Shestakova, K.M., Mesonzhnik, N.V., Markin, P.A. et al. (2021). Pharmacokinetic Properties of the Novel Synthetic Cannabinoid 5F-APINAC and Its Influence on Metabolites Associated with Neurotransmission in Rabbit Plasma. Pharmaceuticals, 14(7), 668.

Soares, A., Silva, A.C., Tinkov, A.A. et al. (2020). The impact of manganese on neurotransmitter systems. Journal of trace elements in medicine and biology, 61, 126554.

Toxicogenomics:principles and applications / edited by Hisham K. Hamadeh, Cynthia A. Afshari. — Hoboken, N. J.: Wiley-Liss, 2004. — 361 p.

Zvereva I., Dudko G., Dikunets M. Determination of GnRH and its synthetic analogues' abuse in doping control: Small bioactive peptide UPLC-MS/MS method extension by addition of in vitro and in vivo metabolism data; evaluation of LH and steroid profile parameter fluctuations as suitable biomarkers. Drug Test Anal. 2018 Apr;10(4):711-722. doi: 10.1002/dta.2256. Epub 2017 Sep 28. PMID: 28777889.

Федеральные законы, ведомственные приказы, методические рекомендации

* Уголовный кодекс Российской Федерации от 13 июня 1996 г. № 63-ФЗ. * Федеральный закон «О наркотических средствах и психотропных веществах» №3-ФЗ от 14 апреля 1998 г., действует в редакции от 08.12.2020. *

Федеральный закон «Кодекс Российской Федерации об административных правонарушениях» от 30 декабря 2001 г. № 195-ФЗ. * Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 27 января 2006 г. № 40 «Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ». * Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 12 мая 2010 г. № 346н «Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации». * Постановление Правительства Российской Федерации от 19 ноября 2012 г. № 1178 «О внесении изменения в перечень наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации». * Федеральный закон от 31 декабря 2014 г. № 528-ФЗ «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации по вопросу усиления ответственности за совершение правонарушений в сфере безопасности дорожного движения». * Приказ Министерства здравоохранения РФ от 18 декабря 2015 г. № 933н «О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)». * Постановление Правительства Российской Федерации от 24 июля 2021 г. № 1259 «Об утверждении перечня одурманивающих веществ». * Информационное письмо ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы», 2019 г.: Судебно-химическое исследование волос, ногтевых срезов, крови, мочи, органов и тканей трупа на наличие психоактивных веществ, включая метаболиты/маркеры синтетических каннабимиметиков методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием (авторы Савчук С.А., Григорьев А.М.) * Надлежащая клиническая практика. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 52379–2005. Утвержден Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 сентября 2005 г. № 232-ст. * Надлежащая лабораторная практика. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ 33044–2014. Утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 2 декабря 2009 г. №544-ст.

Интернет-ресурсы

* https://www.wada-ama.org/en/prohibited-list * https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/world-anti-doping-code * https://www.wada-ama.org/en/resources/world-anti-doping-program/international-standard-laboratories-isl * 2020 Anti-doping testing Figures, WADA Technical Document – Режим доступа: https://www.wada-ma.org/sites/default/files/2022-01/2020_anti-doping_testing_figures_en.pdf * https://www.science.org.au/curious/people-medicine/erythropoietin-epo J. Proteome Res. 2018, 17, 1, 689–697 Publication Date: December 2, 2017