

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОКСИБЕНЗОЛА И 4-МЕТИЛГИДРОКСИБЕНЗОЛА В ОРГАНИЗМЕ ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЛЕТАЛЬНЫХ ОТРАВЛЕНИЯХ

А.П. Асташкина, канд. хим. наук,
О.И. Пугачева, В.К. Шорманов*, докт. фарм. наук, профессор,
М.К. Елизарова, канд. фарм. наук, **М.А. Останин**
Курский государственный медицинский университет;
305041, Курск, ул. К. Маркса, д. 3

E-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru

Изучены особенности распределения гидроксибензола и 4-метилгидроксибензола в организме всеядных теплокровных животных (крысы) при внутрижелудочном введении трехкратных летальных доз отравляющих веществ. Установлено, что анализируемые вещества в неизменном виде в значительных количествах обнаруживаются во внутренних органах и крови отравленных животных, в частности гидроксибензол (мг/100 г) превалирует в желудке, а 4-метилгидроксибензол – в желудке и селезенке.

Ключевые слова: гидроксибензол, 4-метилгидроксибензол, распределение, химико-токсикологический анализ.

Гидроксибензол (ГОВ) и 4-метилгидроксибензол (4-МГОВ) – биологически активные вещества, обладающие сильным антисептическим действием. Они входят в состав березового дегтя и креозота, являются полупродуктами синтеза полимеров, лекарственных средств, красителей, пестицидов, побочными продуктами коксо-химических производств [1–3]. ГОВ и 4-МГОВ – наиболее распространенные экотоксиканты природных водоемов [4].

По физическим свойствам ГОВ и 4-МГОВ – бесцветные кристаллы, постепенно розовеющие на воздухе, с характерным запахом и температурами плавления соответственно 40,9°C и 34°C [5]. Растворимость в воде (г/1000 мл) ГОВ составляет 82 при температуре 20°C и 67 при 16°C, 4-МГОВ – 24 при 40°C и 53 при 100°C [6]. ГОВ смешивается с диэтиловым эфиром и этиловым спиртом, очень хорошо растворим в диоксане и бензоле, легко растворим – в хлороформе, растворим в растворах щелочей. 4-МГОВ легко растворим в этиловом спирте, ацетоне, диоксане, растворим в эфире, хлороформе, растворах щелочей [5, 6].

Данные соединения токсичны для теплокровных организмов. LD₅₀ ГОВ (в мг/кг) составляет при

внутрижелудочном введении для крыс 512, для мышей – 427, при подкожном введении для крыс – 670, для мышей – 510. LD₅₀ 4-МГОВ (в мг/кг) составляет при внутрижелудочном введении для крыс и мышей соответственно 1004 и 828, при подкожном введении для мышей – 750 [7, 8]. Описаны случаи отравления людей ГОВ и 4-МГОВ различной степени тяжести, в том числе с летальным исходом. Летальные дозы ГОВ и 4-МГОВ для человека при приеме данных веществ внутрь составляют 1–30 и 2 г соответственно [1, 6, 9]. Токсические свойства ГОВ и 4-МГОВ, наличие случаев летального отравления рассматриваемыми веществами делают их потенциальными объектами химико-токсикологического исследования [10]. Отдельные вопросы химико-токсикологического анализа ГОВ и 4-МГОВ изучены недостаточно, в частности распределение данных соединений в организме теплокровных при летальных отравлениях.

Цель настоящей работы – изучение особенностей распределения ГОВ и 4-МГОВ в организме всеядных теплокровных животных при летальных отравлениях, вызванных внутрижелудочным введением отравляющих веществ.

Экспериментальная часть

Объектами исследования явились ГОВ (ч.д.а.) и 4-МГОВ (х.ч.) с содержанием основных веществ соответственно ≥99,5 и ≥99%.

Исследования проводили на крысах в соответствии с методиками, примененными ранее для изучения распределения некоторых других гидроксиаренов и их метоксипроизводных [10,11]. В каждом случае 25 крысам-самцам породы Wistar 5-месячного возраста (5 опытных групп по 5 особей в каждой с массой 250–280 г) вводили через зонд в же-

лудок тройную дозу LD_{50} отравляющего вещества (512 мг/кг • 3 при исследовании ГОБ или 1004 мг/кг • 3 при исследовании 4-МГОБ). После гибели животных, наступавшей в первые 10–20 мин после введения веществ, трупы вскрывали, одинаковые органы и биожидкости, взятые от животных внутри каждой из групп, объединяли и исследовали на присутствие в них ГОБ или 4-МГОБ. Параллельно исследовали органы и биожидкости 5 животных контрольной группы.

Определенное количество мелкоизмельченных (до размера 0,2–0,5 см) тканей органа или биожидкости заливали двукратным по массе количеством этилацетата, но не менее 4 мл (3,6 г). Смесь выдерживали 45 мин при периодическом перемешивании. Извлечение сливали с твердого остатка, процесс настаивания повторяли. Оба извлечения объединяли в выпарительной чашке, растворитель испаряли в токе воздуха при температуре 18–20°C до незначительного (0,5–1,0 мл) объема, а затем в токе азота до получения сухого остатка [9].

Остаток, полученный после испарения этилацетата из объединенного извлечения, растворяли в 1–1,5 мл смеси гексан – диэтиловый эфир (6:4). Раствор вносили в стеклянную колонку размерами 240×15 мм, заполненную 20 г силикагеля типа L 40/100 мкм. После полного вхождения раствора в слой сорбента в колонку добавляли элюент – гексан – диэтиловый эфир (6:4). Фракции элюата по 2 мл каждая собирали в отдельные пробирки. По 5–10 мкл каждой фракции наносили на хроматографическую пластину типа «Силуфол UV-254» и хроматографировали в присутствии вещества-свидетеля в стеклянных камерах с внутренним объемом около 600 см³, применяя подвижную фазу дихлорэтан – бензол – диэтиловый эфир (7:2:1). По наличию пятен на хроматограмме, величина R_f которых соответствовала таковой стандарта, определяли присутствие исследуемого вещества в той или иной фракции. Фракции элюата, содержащие ГОБ [в стандартных условиях с 5-й по 8-ю фракцию (9–16 мл)] или 4-МГОБ [в стандартных условиях с 10-й по 13-ю фракцию (19–26 мл)], объединяли и упаривали вначале в токе воздуха при комнатной температуре до незначительного (0,5–1,0 мл) объема, а затем в токе азота до получения сухого остатка. Остаток растворяли в 5 мл этилацетата (исходный раствор). В 2 выпарительные чашки вносили по 0,5–2,5 мл исходного раствора и испаряли растворитель в токе азота до полного удаления растворителя.

Остаток в 1-й чашке растворяли в незначительном количестве хлороформа и количественно переносили на линию старта пластины «Силуфол UV-254» в виде полосы. Рядом на линию старта наносили по 5–10 мкл растворов (0,08% в хлороформе) вещества-свидетеля и внутреннего стандар-

та (1,3-дигидроксibenзола). Хроматографировали, используя элюент дихлорэтан – бензол – диэтиловый эфир (7:2:1). Хроматограммы проявляли в УФ-свете. ГОБ или 4-МГОБ идентифицировали по величинам R_f и R_s (по отношению к R_f 1,3-дигидроксibenзола).

В дальнейшем то или иное анализируемое вещество элюировали из сорбента этанолом, идентифицировали по УФ-спектрам и проводили количественное определение по интенсивности поглощения в области 273 нм для ГОБ и 280 нм – для 4-МГОБ. Для этого пятно анализируемого вещества (ГОБ или 4-МГОБ) вырезали из хроматограммы, вносили в пробирку и элюировали вещество 5 или 10 мл этилового спирта путем периодического перемешивания содержимого пробирки в течение 10 мин. Элюат отделяли и исследовали его светопоглощение в интервале длин волн 200–360 нм. Если анализируемое вещество присутствовало в большой концентрации, элюат предварительно разбавляли этиловым спиртом.

Остаток во 2-й чашке растворяли в 2 мл хлористого метилена. 4 мкл полученного раствора вводили в хроматограф 6850 Network GC System с масс-селективным детектором модели 5973 Network. Пробу вводили с делением потока 1:2. Хроматографировали в кварцевой капиллярной колонке DB-5 MS EVIDEX (25 м×0,2 мм) со слоем неподвижной фазы [(5%-фенил)-метилполисилоксан] толщиной 0,33 мкм. Температура инжектора составляла 250°C, интерфейса детектора – 300°C. Начальная температура термостата колонки (70°C) поддерживалась в течение 3,0 мин, затем увеличивалась до 290°C со скоростью 20°C/мин. Газом-носителем являлся гелий, скорость подачи которого составляла 0,6 мл/мин. Масс-селективный детектор работал в режиме электронного удара (70 эВ). Диапазон сканирования находился в пределах 40–500 m/z. Вещества идентифицировали по совпадению масс-спектров с библиотечными (библиотека Wiley-7nl) на 86% и более. Также при идентификации учитывали характерные значения времени удерживания. При определении ГОБ и 4-МГОБ сигнал регистрировали по полному ионному току с задержкой на растворитель в 3,5 мин.

По величине оптической плотности этанольного элюата, измеренного при длине волны 273 нм (для ГОБ) или 280 нм (для 4-МГОБ), определяли количественное содержание того или иного рассматриваемого соединения. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-2000 в кюветах с длиной оптического пути 10 мм. Раствор сравнения – элюат, полученный в контрольном опыте. По величине оптической плотности этанольного элюата определяли количественное содержание того или иного анализируемого вещества.

В ходе исследования при идентификации методом ТСХ анализируемые вещества проявлялись на хроматограммах в УФ-свете в виде темных пятен на более светлом общем фоне пластины. Величины R_f и R_s ГОБ (0,55 и 1,67) и 4-МГОБ (0,58 и 1,76) соответствовали величинам R_f веществ-стандартов. В процессе идентификации методом УФ-спектрофотометрии при сравнении спектральных кривых веществ, извлеченных из биоматериала и очищенных по вышеописанной схеме, со спектрами чистых веществ в этаноле выявлено совпадение форм спектральных кривых и положения точек экстремумов. Все спектральные кривые ГОБ (рис. 1) имеют длинноволновую полосу поглощения с максимумом 273 ± 2 нм, спектральные кривые 4-МГОБ (рис. 2) — длинноволновую полосу с максимумом 280 ± 2 нм. При исследовании извлечений из тканей внутренних органов и крови крыс, не получавших ГОБ и 4-МГОБ, установлено отсутствие данных веществ в паренхиматозных и полых органах, а также в крови животных контрольной серии. Измеренное при длинах волн 273 и 280 нм фоновое поглощение элюатов из участков хроматограмм, по площади и положению относительно линии старта соответствующих тому или иному анализируемому веществу, не превышало 0,022 единиц оптической плотности для извлечений из органов и 0,016 из крови.

При идентификации методом ГХ МС значения времени удерживания ГОБ и 4-МГОБ совпадали со значениями времени удерживания веществ-стандартов и составляли соответственно 6,14 и 7,35 мин. В масс-спектрах присутствовали сигналы характерных осколков (заряженных частиц) для молекул ГОБ — 39, 51, 55, 66, 94 m/z ; основной (молекулярный) ион — 94 m/z , и 4-МГОБ — 39, 51, 53, 55, 63, 65, 77, 90, 107 m/z ; основной (молекулярный) ион — 107 m/z . На хроматограммах анализируемых веществ не обнаруживалось (по сравнению с хроматограммами веществ-стандартов) присутствие дополнительных пиков и заметного смещения базовой линии.

Градуировочные графики для фотометрического определения ГОБ и 4-МГОБ по характеру поглощения в УФ-области спектра в данном случае соответствовали описывались уравнениями: $A = 0,019177 \cdot C - 0,004522$ и $A = 0,016774 \cdot C + 0,0014420$, где A — оптическая плотность, C — концентрация анализируемого вещества в фотометрируемом растворе (мкг/мл). Относительная ошибка среднего результата при определении ГОБ и 4-МГОБ методом УФ-спектрофотометрии ($n=6$, $r=0,95$) не превышала 0,9%.

Установлено, что ГОБ и 4-МГОБ присутствуют в неизменном виде как в органах, так и в крови погибших организмов. Наибольшие количества ГОБ (мг в 100 г органа или биожидкости) обнаруживаются в желудке ($1321,11 \pm 60,75$), тонком кишечни-

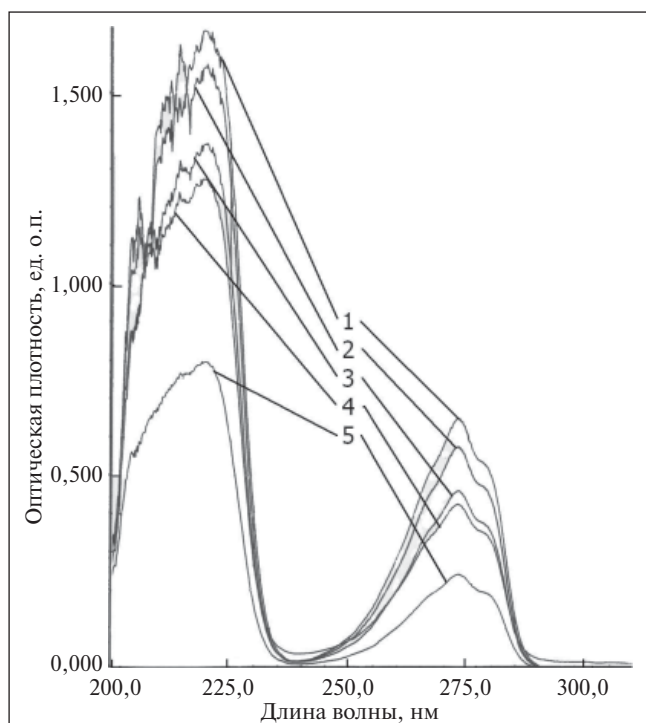


Рис. 1. Спектральные кривые гидроксибензола в этиловом спирте: 1 — извлеченного из желудка; 2 — из тонкого кишечника; 3 — из селезенки; 4 — 0,002 % раствор вещества-стандарта; 5 — из сердца

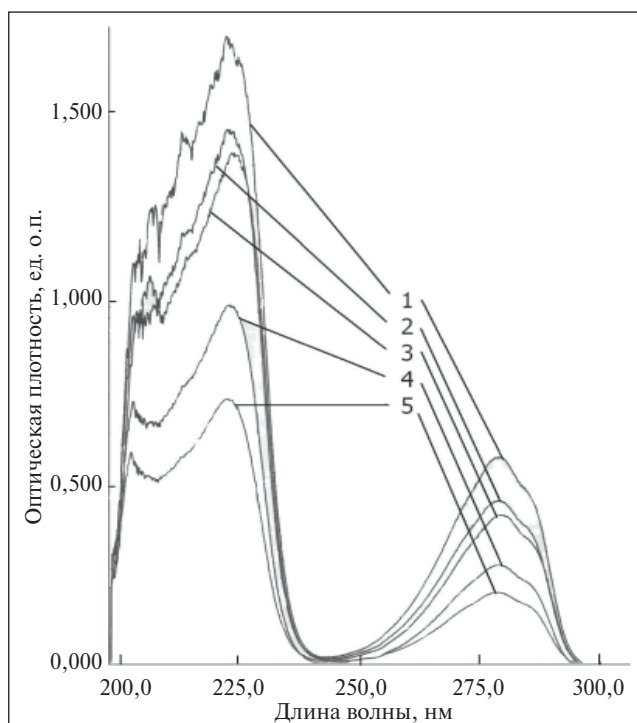


Рис. 2. Спектральные кривые 4-метилгидроксибензола в этиловом спирте: 1 — извлеченного из желудка; 2 — из селезенки; 3 — из тонкого кишечника; 4 — 0,002% раствор вещества-стандарта; 5 — из печени

ке ($210,19 \pm 14,34$), селезенке ($157,29 \pm 59,66$) и сердце ($89,29 \pm 3,84$), несколько меньшие его количества — в легких ($54,71 \pm 2,00$) и печени ($54,01 \pm 2,96$) отравленных животных. Наибольшее количество 4-МГОБ (1 мг в 100 г биоматериала) выявлено в желудке ($2965,34 \pm 212,61$), селезенке ($989,63 \pm 153,35$), тонком кишечнике ($657,00 \pm 57,34$) и печени ($303,89 \pm 18,68$), несколько меньшие — в легких ($230,81 \pm 17,58$), сердце ($193,13 \pm 16,36$) и мышцах ($189,34 \pm 7,95$) погибших организмов.

Выводы

1. Изучено распределение гидроксибензола и 4-метилгидроксибензола в организме теплокровных животных (крысы) при однократном введении тройной дозы LD_{50} каждого из веществ в желудок.

2. Установлено присутствие рассматриваемых веществ в неизменном виде в органах и крови погибших животных.

3. Наибольшие количества гидроксибензола обнаруживаются в желудке, тонком кишечнике, селезенке и сердце, а 4-метилгидроксибензола — в желудке, селезенке, тонком кишечнике и печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Могош Г. Острые отравления. Бухарест: Медицинское издательство, 1984; 580.

2. Мухом В.И., Скворода В.И. Гигиеническая оценка загрязнения атмосферного воздуха предприятием, перерабатывающим фенол-формальдегидные смолы. Здравоохранение Белоруссии, 1980; 12: 25–27.

3. Michatowicz J., Duda W. Phenols – Sources and Toxicity. Polish J. of Environ. Stud., 2007; 16 (3): 347–362.

4. Суханов П.Т., Чурилина Е.В., Губин А.С., Кузнецова И.С., Чистякова А.А., Машкина А.А., Шаталов Г.В. Сорбция фенола и крезолов из водных растворов сетчатыми полимерами на основе N-винилпирролидона. Сорбционные и хроматографические процессы, 2012; 12 (5): 712–718.

5. Smith M.B., March J. March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, mechanisms, and structure. 6th ed. New York: Wiley-Interscience, 2007; 2357.

6. Предельно допустимые концентрации вредных веществ в воздухе и в воде. Под ред. Ю.А. Кротова. Л.: Химия, 1975; 456.

7. Gardner's Commercially Important Chemicals: Synonyms, Trade Names, and Properties (ed. By G. W. A. Milne). Hoboken: Wiley&Sons, 2005; 1092.

8. Сурсякова В.В., Бондарева Л. Г., Бурмакина Г.В., Рубайло А.И. Новые подходы к выявлению источников поступления фенолов в поверхностные водоемы. Доклады Академии наук, 2011; 441 (6): 379–382.

9. Лудевиг Р., Лос Н. Острые отравления. М.: Медицина, 1983; 559.

10. Асташкина А.П., Шорманов В.К., Останин М.А., Гришечко О.И., Елизарова М.К. Особенности распределения 2- и 3-метоксипроизводных гидроксибензола в организме теплокровных животных. Фармация, 2013; 62 (5): 5–8.

11. Пугачева О.И., Асташкина А.П., Шорманов В.К., Останин М.А. Особенности распределения 2,4- и 2,6-диметилных производных гидроксибензола в организме теплокровных животных. Судебно-медицинская экспертиза, 2014; 57 (4): 44–48.

Поступила 23 августа 2015 г.

DISTRIBUTION OF HYDROXYBENZENE AND 4-METHYLHYDROXYBENZENE IN WARM-BLOODED ANIMALS WITH FATAL INTOXICATIONS

A.P. Astashkina, PhD; O.I. Pugacheva; Professor V.K. Shormanov, PhD; M.K. Elizarova, PhD; M.A. Ostanin
Kursk State Medical University; 3, K. Marx St., Kursk 305041

SUMMARY

The authors investigated the specific features of the distribution of hydroxybenzene and 4-methoxyhydroxybenzene in warm-blooded omnivorous animals (rats) when the triple lethal doses of the toxic substances were intragastrically administered. Acetone was used to isolate hydroxybenzene and 4-methoxyhydroxybenzene from the viscera and blood of the animals. The extracts were purified in a column packed with silica gel L 40/100 μm (hexane/ diethyl ether (6:4) as an eluent). Thin layer chromatography, liquid chromatography-mass spectrophotometry, and ultraviolet spectrophotometry were used for the identification and assay of the substances in question. Hydroxybenzene and 4-methoxyhydroxybenzene were ascertained to be detected unchanged in significant amounts in the viscera and blood of the poisoned animals; hydroxybenzene (mg/100 g) being prevalent in the stomach, small bowel, spleen, and heart; 4-methoxyhydroxybenzene in the stomach, spleen, small bowel, and liver.

Key words: hydroxybenzene, 4-methoxyhydroxybenzene, distribution, chemical and toxicological analysis.

REFERENCES

1. Mogosh G. Acute Poisonings. Bukharest: Meditsinskoe izdatelstvo, 1984; 580 (in Russian).
2. Murokh V.I., Skovoroda V.I. Hygienic assessment of air pollution by enterprises processing phenol-formaldehyde resins. Zdravookhranenie Belorussii, 1980; 12: 25–27 (in Russian).
3. Michatowicz J., Duda W. Phenols – Sources and Toxicity. Polish J. of Environ. Stud., 2007; 16 (3): 347–362.
4. Sukhanov P.T., Churilina E.V., Gubin A.S., Kuznetsova I.S., Chistyakova A.A., Mashkina A.A., Shatalov G.V. Phenol and cresols sorption from aqueous solutions with cross-linked polymers based on N-vinylpyrrolidone. Sortsionnye i chromatograficheskie protsessy, 2012; 12 (5): 712–718 (in Russian).
5. Smith M.B., March J. March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, mechanisms, and structure. 6th ed. New York: Wiley-Interscience, 2007; 2357.
6. Maximum permissible concentrations of harmful substances in the air and water (ed. by Y.A. Krotova). Leningrad: Khimiya, 1975; 456 (in Russian).
7. Gardner's Commercially Important Chemicals: Synonyms, Trade Names, and Properties (ed. By G. W. A. Milne). Hoboken: Wiley&Sons, 2005; 1092.
8. Sursyakova V.V., Bondareva L.G., Burmakina G.V., Rubaylo A.I. New approaches to identifying sources of phenols in surface waters. Doklady Akademii nauk, 2011; 441 (6): 379–382 (in Russian).
9. Ludevig R., Los N. Acute poisonings. Moscow: Meditsina, 1983; 559 (in Russian).
10. Astashkina A.P., Shormanov V.K., Ostanin M.A., Grishechko O.I., Elizarova M.K. Features of distribution of 2- and 3-methoxyhydroxybenzene derivatives in the body of warm-blooded animals. Farmatsiya, 2013; 62 (5): 5–8 (in Russian).
11. Pugacheva O.I., Astashkina A.P., Shormanov V.K., Ostanin M.A. Features of distribution of 2,4- and 2,6-methylhydroxybenzene derivatives in the body of warm-blooded animals. Sudebno-meditsinskaya ekspertiza, 2014; 57 (4): 44–48 (in Russian).