

МАРУЦЕНКО ИРИНА ВЛАДИМИРОВНА

**Определение органических ксенобиотиков в волосах человека методом
высокоэффективной тонкослойной хроматографии**

02.00.02 - аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук



Москва - 2004

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель:

кандидат химических наук, доцент Поленова Татьяна Владимировна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор Панин Сергей Николаевич

кандидат химических наук, доцент Гурковская Елена Александровна

Ведущая организация:

Институт высокомолекулярных соединений РАН, г. Санкт-Петербург

Защита состоится 23 июня 2004 г. в 16 часов 10 минут в ауд. 344 на заседании диссертационного Совета Д.501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119899, Москва, Ленинские горы, МГУ, химический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан 21 мая 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного Совета,
кандидат химических наук



Торочешникова И.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В последнее десятилетие резко возрос интерес к анализу следовых количеств органических веществ. Вместе с тем начал расширяться и круг объектов этого анализа - в частности, медико-биологических, к которым относятся биологические жидкости и ткани. С появлением высокочувствительных инструментальных методов биомониторинг инородных органических веществ сразу же приобрел практическое значение в таких сферах жизнедеятельности людей, как медицина, токсикология, судебно-медицинская экспертиза, криминалистика и экология. Возник интерес и в социальной сфере, благодаря возможности контролировать употребление наркотических, психотропных и допинговых препаратов сотрудниками опасных областей производства или спортсменами. Остался, однако, ряд нерешенных проблем.

Классическими объектами арбитражного анализа считаются кровь и моча. Извлечение соединений из них, как правило, проводится с помощью различных методов экстракции. Однако указанные объекты имеют большой недостаток: инородные соединения метаболизируют в крови и быстро выводятся из организма человека с мочой. Первая проблема биомониторинга состоит в том, что анализ биожидкостей характеризует только текущий процесс выведения вещества. Поэтому в настоящее время многие зарубежные исследователи обратились к использованию нетрадиционных объектов анализа - таких, как волосы человека. Волосы являются естественным сорбентом, постепенно накапливающим в своей структуре те соединения, которые либо не попадают, либо малоустойчивы в крови и моче, что дает возможность получения информации об их воздействии на организм в течение длительного времени. Тем не менее, вторая проблема современного биомониторинга заключается в том, что сложность химического состава и низкое содержание ксенобиотиков в матрице ограничивают широкое использование волос как объекта анализа.

Основными методами определения ксенобиотиков в волосах человека являются иммуноферментный анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография и газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием. Несмотря на очевидные достоинства перечисленных методов их за длительное время применять

для целей мониторинга из-за длительности анализа и высокой стоимости оборудования. Напротив, высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ) удовлетворяет требованиям скрининга, но мало популярна для решения сложных аналитических задач из-за низкой чувствительности метода. Сочетание ВЭТСХ с предварительным концентрированием аналитов дает возможность избежать этого недостатка.

Третья проблема заключается в стандартизации процедуры анализа. Говоря о степени извлечения ксенобиотиков из структуры волос, исследователи оперируют такими понятиями, как «больше» или «меньше», и порой опрометчиво судят о полноте десорбции вещества из протеиновой матрицы.

Четвертая проблема связана с ограниченностью круга ксенобиотиков, которые удалось определить в волосах человека. Наиболее изученным является определение в волосах наркотических препаратов - опиатов, каннабиноидов и кокаина. Часть исследований посвящена вопросам, связанным с обнаружением лекарственных препаратов, но при этом нет данных о том, включаются ли в структуру волос неполярные канцерогенные соединения, например, полиароматические углеводороды (ПАУ). Вполне очевидно, что на данный момент возможности определения ПАУ в организме человека остаются практически неиспользованными, несмотря на увеличение числа курящих людей, неблагоприятную экологическую обстановку и прочие негативные факторы.

Цель работы заключалась в оценке возможностей и разработке скрининговой процедуры на основе сочетания высокоэффективной тонкослойной хроматографии с микрожидкостной экстракцией (МЖЭ) для определения психотропных препаратов и полиароматических углеводородов в волосах человека. Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить экстракционное поведение ряда психотропных лекарственных препаратов и некоторых представителей класса ПАУ, используемых в работе в качестве модельных соединений, и оценить возможность реализации микрожидкостной экстракции на стадии предварительного концентрирования определяемых компонентов.

2. Оптимизировать условия, оценить метрологические характеристики и получить количественные характеристики группового и внутригруппового определения модельных соединений методом ВЭТСХ.

3. Изучить закономерности сорбции модельных соединений на волосах человека из газовой фазы и из раствора с целью создания образцов сравнения для определения органических ксенобиотиков.

4. Изучить эффективность различных способов извлечения органических веществ из модельных образцов волос и выбрать оптимальный «матричный растворитель»¹.

5. Разработать методики скрининга лекарственных препаратов и ПАУ в волосах человека на основе сочетания микрожидкостной экстракции и высокоэффективной тонкослойной хроматографии.

Научная новизна. Изучено экстракционное концентрирование ряда лекарственных препаратов (фенотиазиновых производных, антидепрессантов и дифенгидрамина) в наиболее перспективной для МЖЭ системе гексан - вода. Показана принципиальная возможность реализации микрожидкостной экстракции на стадии предварительного концентрирования определяемых компонентов. Изучено хроматографическое поведение модельных ксенобиотиков в ВЭТСХ системах с различными подвижными и неподвижными фазами. Изучена сорбция соединений класса ПАУ из сигаретного дыма и модельных лекарственных препаратов из водных растворов на волосы человека. На основе полученных закономерностей разработан подход, позволяющий провести оценку соотношения внутреннего (эндогенного) и внешнего (экзогенного) загрязнений волос человека. Изучена эффективность различных способов извлечения органических веществ из белковой структуры волоса и предложены принципиально новые способы извлечения полярных и неполярных органических ксенобиотиков из волос человека.

Практическая значимость работы. Доказано, что полиароматические углеводороды аккумулируются в волосах курильщиков. Предложены способы приготовления стандартных образцов волос с известным эндогенным содержанием органических ксенобиотиков на основе двух подходов: сорбции из газовой фазы и из

¹ раствор вещества или смеси веществ, разлагающий волосы

водного раствора. Для группового определения соединений класса ПАУ предложена новая хроматографическая система с подвижной фазой состава гександихлорметан-нитробензол (5:5:0.1). Разработаны методики скрининга лекарственных препаратов и ПАУ в волосах человека на основе сочетания микрожидкостной экстракции и высокоэффективной тонкослойной хроматографии. Проведено определение некоторых лекарственных препаратов в волосах пациентов психиатрических клиник, а также групповое определение ПАУ в волосах курильщиков.

Автор выносит на защиту:

1. Результаты изучения экстракционного поведения модельных лекарственных препаратов в системе гексан - вода.
2. Результаты исследования поведения модельных лекарственных препаратов в тринадцати хроматографических системах с различными подвижными и неподвижными фазами.
3. Способ модификации подвижной фазы при групповом ВЭТСХ определении соединений класса ПАУ.
4. Результаты изучения сорбции соединений класса ПАУ из сигаретного дыма и модельных лекарственных препаратов из водных растворов на волосах человека.
5. Разработанный подход для оценки соотношения внутреннего (эндогенного) и внешнего (экзогенного) загрязнений и способы приготовления образцов сравнения для определения органических ксенобиотиков в волосах человека.
6. Данные по изучению эффективности различных способов извлечения органических веществ из белковой структуры человеческого волоса и предложенные в работе новые способы извлечения полярных и неполярных органических ксенобиотиков.
7. Методики скрининга лекарственных препаратов и ПАУ в волосах человека на основе сочетания микрожидкостной экстракции и высокоэффективной тонкослойной хроматографии.

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены на международных симпозиумах «Balaton Symposium'99 on high-performance separation methods» (Венгрия, 1999 г.), «Planar Chromatography-2001» (Венгрия, 2001 г.), «Разделение и концентрирование в аналитической химии» (Россия, Туапсе, 2002

г.) и VIII Международной научно-практической конференции «Косметические средства и сырье: безопасность и эффективность» (Россия, Москва, 2003 г.)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ 3 статьи и 6 тезисов докладов

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, списка сокращений, обзора литературы (3 раздела), экспериментальной части и обсуждения результатов (4 раздела), приложения, выводов и списка литературы (166 наименований). Работа изложена на 157 страницах машинописного текста, содержит 24 рисунка и 23 таблицы. В обзоре литературы систематизированы сведения об объекте анализа, стадиях пробоподготовки волос, методах анализа волос и классах определяемых соединений. В последующих разделах изложены результаты экспериментальных исследований и их обсуждение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальная часть

Органические ксенобиотики, определяемые в волосах человека, можно условно разделить на полярные и малополярные соединения. Кроме того, классификацию можно провести и на основе принципа поступления органических веществ в волосы некоторые соединения могут быть включены в структуру волос преимущественно эндогенным путем (через кровь и прочие биожидкости организма), для других характерен как эндогенный, так и экзогенный (из окружающей среды) способ включения. Для полноты исследования было необходимо изучить взаимодействия с матрицей волос некоторых представителей перечисленных групп

В качестве представителей полярных соединений нами были выбраны лекарственные препараты: дезипрамин (DEZ), амитриптилин (AMI), анафранил (ANF), мапротилин (MAP), левомепромазин (LEV), аминазин (AMZ), хлорпротиксен (CLO), сонапакс (SON) и дифенгидрамин (DIF) В организм человека они попадают в виде инъекций или таблеток, то есть для них характерен эндогенный путь проникновения в матрицу волос. Все перечисленные соединения являются органическими третичными аминами. В качестве малополярных модельных соединений были выбраны следующие представители класса полиароматических углеводородов (ПАУ): антрацен, аценафтен, 3,4-бензпирен, пирен, флуорантен и фенантрен В организм человека ПАУ могут попадать из пищи (особенно копченой и жареной) и

грязной воды, но главным путем их внедрения в организм является вдыхание загрязненного воздуха и курение. Для этих соединений возможны два пути проникновения в матрицу волос: эндогенный и экзогенный.

Хроматографическое разделение проводили в вертикальной камере (Ленхром, Россия) на пластинах Silufol без УФ-индикатора (Kavalier, Чехословакия), пластинах Sorbfil с УФ-индикатором 254 нм (Сорбполимер, Россия) и пластинах Merck с УФ-индикатором 254 нм и зоной концентрирования (Merck, Германия). Для нанесения проб использовали микрошприцы объемом 10, 50 мкл (Hamilton, США) и 250 мкл (Camag, Швейцария). Денситометрические измерения проводили на денситометре Camag TLC Scanner 3 с программным обеспечением "Cats 4" (Camag, Швейцария). Спектры водных растворов лекарственных препаратов снимали на регистрирующем спектрофотометре Specord UV VIS в кварцевых кюветах длиной 1 см. Измерения pH проводили на универсальном иономере ЭВ-74. Ультразвуковую обработку волос проводили с использованием УЗ-ванны Branson 2510 (Bransonic, США). На основе сравнения физических характеристик ряда органических экстрагентов, для проведения МЖЭ был выбран гексан. МЖЭ проводили в стеклянном микроэкстракторе (J&W Scientific, США).

Газохроматографический анализ с масс-спектрометрическим детектированием на содержание ПАУ был проведен в лаборатории методов концентрирования кафедры аналитической химии химического факультета МГУ. Газохроматографический анализ с масс-спектрометрическим детектированием на содержание лекарственных препаратов был проведен на кафедре токсикологической химии ММА им. И. М. Сеченова (Республиканский научно-учебно-методический центр аналитической диагностики наличия наркотических средств, психотропных и других токсических веществ в организме человека). Поляризационно-флуоресцентный иммуноанализ на содержание амитриптилина был проведен на кафедре энзимологии химического факультета МГУ.

В исследованиях были использованы волосы головы человека. В качестве модельных (чистых) образцов волос были использованы волосы добровольцев, некурящих и не употреблявших психотропные препараты.

Оптимизация условий хроматографического определения ПАУ

в тонком слое

В настоящей работе было предложено групповое определение ПАУ в тонком слое, что связано, в первую очередь, с низким содержанием этих соединений в выбранном объекте. Нами было исследовано разделение ПАУ в ряде подвижных фаз (ПФ), выбор которых основывался на использовании системы "Призма". Однако, результаты оказались неудовлетворительными. Установлено, что группового определения ПАУ можно достичь, используя акцептор электронов в качестве модификатора ПФ. Среди известных и доступных органических веществ-акцепторов нами был выбран нитробензол (НБ). В качестве подвижной фазы мы выбрали гексан - ДХМ (5:5) из-за простоты компонентного состава и модифицировали ее НБ. Наши исследования показали, что НБ обладает негативным свойством, он гасит флуоресценцию. При относительно небольших его количествах в ПФ интенсивность пика флуоресценции ПАУ может снизиться в два раза. Однако, определенное процентное содержание НБ в ПФ позволяет сузить хроматографическую зону ПАУ и получить более узкий пик на денситограмме, что важно для количественных определений. Поэтому было необходимо выявить зависимость между количеством НБ в ПФ и интенсивностью пика флуоресценции. Полученная зависимость представлена на рис. 1.

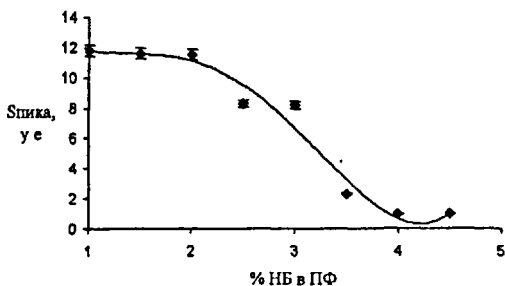


Рис. 1. Зависимость площади пика флуоресценции от количества нитробензола в подвижной фазе

Основываясь на полученных результатах, для дальнейшей работы нами была выбрана ПФ состава гексан - ДХМ - НБ (5:5.0.1). В качестве неподвижной фазы мы выбрали пластины марки Silufol, поскольку на пластинах марки Merck хроматографическая зона ПАУ оказалась более растянутой. Кроме того, сорбент на пластинках марки Merck имеет более плотную структуру, что затрудняет удаление НБ после хроматографирования.

Поскольку НБ является высококипящим растворителем, его сложно удалить с пластины. Как показали наши эксперименты, эффекта снижения температуры кипения НБ удастся добиться, выдерживая пластину в камере, насыщенной парами ледяной уксусной кислоты. Установлено, что оптимальное время выдержки пластины после элюирования в парах ледяной уксусной кислоты составляет 3 минуты. На основе выбранных условий была построена градуировочная зависимость площади пика флуоресценции от общего количества ПАУ в хроматографической зоне. Предел обнаружения смеси ПАУ составил 0.5 нг/зона.

Изучение сорбции ПАУ из сигаретного дыма на волосы человека

Для определения степени извлечения ПАУ из структуры волоса было необходимо приготовить модельные образцы волос с известным содержанием ПАУ. Для этого мы использовали процесс сорбции ПАУ на волосы из газовой фазы. В качестве газовой фазы был выбран сигаретный дым. Чтобы количественно контролировать сорбированные волосами ПАУ, было необходимо определить общее содержание ПАУ в основном потоке сигаретного дыма. Установлено, что среднее общее количество ПАУ в дыме одной сигареты составляет (0.8 ± 0.1) мкг ($P = 0.95$, $n = 10$). Для проверки правильности анализа, после элюирования хроматографическую зону ТСХ-пластины, содержащую ПАУ, соскребали скальпелем, добавляли 200 мкл дихлорметана и экстрагировали. Полученный экстракт использовали для проведения ГХ/МС анализа. Результаты анализа показали наличие в экстракте девяти соединений этого класса: 1-метилнафталин, 1,8-диметилнафталин, 2,6-диметилнафталин, 1,2-диметилнафталин, 1,3-диметилнафталин, флуорен, антрацен, флуорантен и пирен. Присутствие в хроматографической зоне ПАУ метилированных полиароматических углеводородов подтверждает возможность использования данной системы для общегруппового анализа.

В настоящей работе было предложено определение понятий внутреннего и внешнего типов загрязнения, на основе чего были приготовлены образцы волос с известным количеством эндогенно связанных ПАУ. Результаты исследования показали, что в выбранных условиях волосы сорбируют из сигаретного дыма только 5 - 6 % ПАУ. Также была установлена скорость перераспределения ПАУ между поверхностью волоса и его внутренней структурой: уже через 5 суток наблюдается практически полный переход веществ в протеиновую сетку волос. Приготовлен-

ные модельные образцы волос использовали для выбора условий извлечения ПАУ из белковой матрицы.

Выбор условий извлечения ПАУ из матрицы волос

В большинстве известных исследований вещества, извлекаемые из волос, представляют собой полярные молекулы, в отличие от гидрофобных полиароматических углеводов. Мы предположили, что для извлечения ПАУ из волосяной матрицы, необходимо, использовать растворитель с невысокой полярностью. Однако от применения чистого органического растворителя пришлось отказаться - этот подход требует увеличения времени извлечения и последующего упаривания экстракта. Было решено проверить варианты кислотного и щелочного разложения волос. Учитывая плохую растворимость ПАУ в воде и полярных растворителях, было решено добавлять в систему "полярная фаза - волосы" небольшие количества гексана (100 - 150 мкл) перед УЗ-обработкой. В эксперименте использовали приготовленные модельные образцы волос. Навеска волос в каждом случае составляла 100 мг, объем «матричного растворителя» 4 мл. После окончания УЗ-обработки полученную вытяжку переносили в микроэкстрактор и экстрагировали в 200 мкл гексана. При использовании ледяной уксусной кислоты вытяжку перед проведением МЖЭ разбавляли водой (3 мл) для расслоения фаз. Количество ПАУ в концентрате определяли методом ВЭТСХ. Как видно из данных, приведенных в табл. 1, наиболее эффективным «матричным растворителем» является ледяная уксусная кислота.

Таблица 1

Использование различных «матричных растворителей» для извлечения ПАУ

из волос. $t_{УЗ} = 30 \text{ мин}$ ($P = 0.95$, $n = 3$)

Полярная фаза	Ледяная CH_3COOH	0.5 М HCl	HNO_3 конц.	2 М КОН	0.5 М КОН
Степень извлечения, %	81.3 ± 6.3	43.1 ± 7.1	7.4 ± 3.3	18.2 ± 3.2	23.5 ± 5.4

Также установлено, что оптимальное время извлечения ПАУ из волос составляет 20 минут при комнатной температуре. Используя модельные образцы волос,

свободные от внешнего загрязнения, нами была определена степень извлечения ПАУ из структуры волос при выбранных условиях. Она составляет около 80 %. Таким образом, в данном исследовании был разработан способ определения ПАУ в волосах человека, состоящий из следующих этапов (объемы растворителей указаны для массы образца волос 100 мг)

- измельчение пробы и взвешивание,
- обработка навески волос ледяной уксусной кислотой (~ 4 мл) и гексаном (100 мкл) в УЗ-ванне при комнатной температуре,
- перенос вытяжки в микроэкстрактор, разбавление водой и экстракция гексаном,
- перенос всего объема экстракта (~ 200 мкл) в тонкий слой и элюирование в системе гексан - ДХМ - НБ (5 5 0 1),
- выдержка ТСХ-пластины в парах ледяной уксусной кислоты и затем в нагретой до 100 °С муфельной печи для удаления нитробензола,
- сканирование пластины на денситометре «Самag»,
- обработка полученных результатов

На основе подхода к приготовлению образцов волос с известным количеством ПАУ, было проведено исследование защитного воздействия препарата «Хитокси-20» на воюсы человека по заказу НПП «Аквион». Было установлено, что а) обработка волос 10% раствором «Хитокси-20» в 4 раза снижает загрязнение волос ПАУ сигаретного дыма, б) обработка волос 10% раствором «Хитокси-20» практически не оказывает влияние на проникновение сорбированных на поверхности ПАУ во внутреннюю структуру волос.

Определение параметров экстракции лекарственных препаратов в системе вода - гексан

Процесс экстракции контролировали спектрофотометрически, измеряя оптические плотности водной фазы. Для выбора оптимальной длины волны были сняты спектры поглощения водных растворов гидрохлоридов амитриптилина, анафранила, левомепромазина, аминазина и димедрола в области рН 2 - 3 (рис. 2). На основании полученных данных были выбраны рабочие длины волн, для которых рассчитали молярные коэффициенты поглощения (табл. 2).

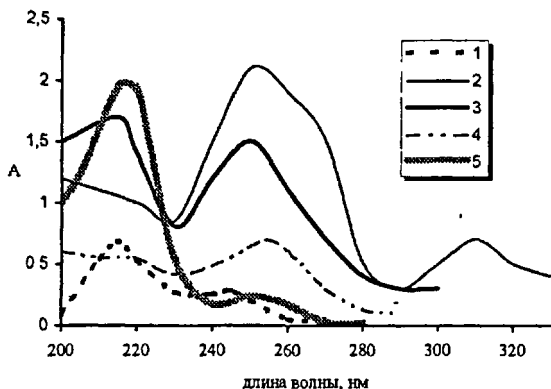


Рис. 2. Спектры поглощения водных растворов веществ 1 - AMI, 2 - AMZ, 3 - ANF, 4 - LEV, 5 - DIF

Результаты исследования экстракции приведены в табл. 2.

Таблица 2

Молярные коэффициенты поглощения водных растворов веществ и параметры экстракции веществ из воды в гексан

Вещество	λ , нм	ϵ , $\text{см}^{-1}\text{моль}^{-1}$	$t_{\text{экстр}}$, сек	R_{max} , %	D_{max}
Амитриптилин	245	$(3.4 \pm 0.4) \cdot 10^4$	60	93 ± 2	13 ± 1
Анафранил	251	$(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^4$	90	90 ± 1	9 ± 1
Левомепромазин	255	$(2.4 \pm 0.2) \cdot 10^4$	90	87 ± 1	7 ± 2
Аминазин	253	$(3.2 \pm 0.1) \cdot 10^4$	90	97 ± 1	22 ± 1
Дифенгидрамин	215	$(8.8 \pm 0.6) \cdot 10^3$	60	98 ± 1	24 ± 1

При экстракции органических соединений из воды в неполярный растворитель основную и определяющую роль играет гидрофобность соединения, которая, в свою очередь, определяется наличием и характером заместителей в молекуле. Согласно этим соображениям, наиболее гидрофобным и наименее полярным среди выбранных для изучения препаратов является дифенгидрамин (не содержит заместителей), а наименьшей гидрофобностью обладают молекулы левомепромазина, которые содержат электронодонорную метокси-группу и разветвленную алифатическую цепь. Это подтверждают и полученные экспериментальные данные. Установлено, что при изменении соотношения объемов контактирующих фаз до 50:1 значения степени экстракции R и коэффициента распределения D практически не

изменяются. Этот факт свидетельствует о принципиальной возможности реализации варианта микрожидкостной экстракции при концентрировании лекарственных препаратов в системе вода/гексан.

Оптимизация условий хроматографического определения лекарственных препаратов в тонком слое

В рамках настоящей работы было изучено хроматографическое разделение девяти лекарственных препаратов в тринадцати подвижных фазах. Выбор этих фаз был сделан нами на основе общепринятых критериев и соображений, касающихся химической природы разделяемых компонентов. В процессе выбора ПФ были использованы принципы системы «Призма». Установлено, что оптимальной для внутригруппового разделения является подвижная фаза состава гексан - ацетон - хлороформ - трибутиламин (ТБА) (2:2:2:0.2). При этом в качестве НФ были использованы пластины марки Sorbfil. Помимо внутригруппового разделения, представляло интерес отделить вещества, близкие по свойствам и строению, от других возможных соединений, например, соединений, обладающих кислотными свойствами. Это необходимо для варианта группового определения или в том случае, когда ТСХ используют в качестве метода предварительной очистки.

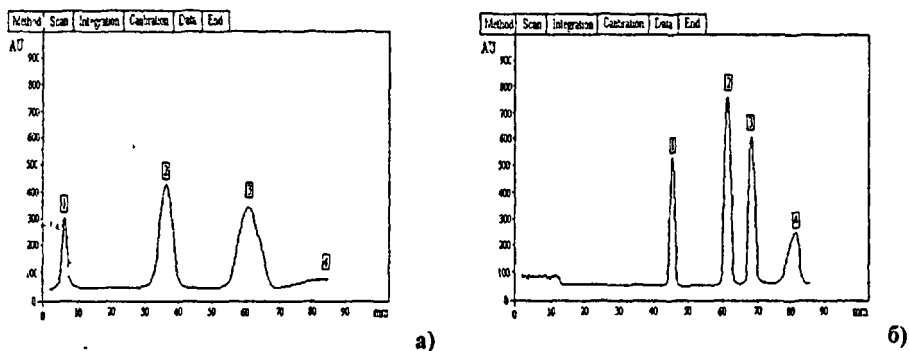


Рис. 3. Денситограммы пластин после элюирования: а) 1 - фенобарбитал, парацетамол, ацетилсалициловая кислота, 2 - MAP и DEZ, 3 - AMI, ANF, LEV, AMZ, SON, CLO и DIF, 4 - фронт растворителя; б) 1 - MAP и DEZ, 2 - AMI, ANF, AMZ, SON и DIF, 3 - LEV и CLO, 4 - фенобарбитал, парацетамол, ацетилсалициловая кислота во фронте растворителя

Как видно из рис. 3, такие результаты достигаются при использовании ПФ (а) гексан - ацетон - диэтиламин (6:3:1) и (б) спиртовой раствор CH_3COONa – ТБА (4:0.2). В обоих случаях вещества основного характера полностью отделяются от других соединений, обладающих кислотными свойствами - парацетамола, ацетилсалициловой кислоты и фенобарбитала. В выбранных условиях были построены градуировочные зависимости площади пика поглощения вещества от его количества в хроматографической зоне. Показано, что пределы обнаружения соединений и воспроизводимость результатов зависят от типа хроматографических пластин и не зависят от состава подвижной фазы. Были оценены пределы обнаружения для вариантов денситометрического (для пластин Merck и Sorbfil) и визуального детектирования. Для визуального детектирования были использованы реактив Марки, концентрированная азотная кислота и тетраданокобальтат калия (ТРКК). Установлено, что наиболее чувствительным и селективным является реактив Марки. ТРКК селективен для определения органических аминов в присутствии соединений других классов, однако, при внутригрупповом определении он не подходит - все модельные соединения окрашиваются в ярко-голубой цвет. Концентрированная азотная кислота подходит для обнаружения DEZ и ANF, по отношению к которым является весьма чувствительным, но неселективным реагентом.

Изучение сорбции лекарственных препаратов из водных растворов на волосы человека

Вопрос, касающийся сорбционного поведения определяемых соединений на волосистой матрице, в литературе не освещен. Между тем он имеет принципиальное значение для выбора правильной схемы пробоподготовки, исключающей возможность потерь определяемого вещества на различных ее этапах (промывка и удаление жировых загрязнений, вскрытие пробы и т.д.). Для того чтобы изучить степень извлечения лекарственных препаратов из человеческих волос, путем сорбции из водных растворов были приготовлены стандартные образцы волос, содержащие известное количество исследуемых соединений. Сначала была изучена зависимость степени сорбции AMI, ANF, DIF, LEV и AMZ на волосы от pH растворов (рис. 4). Изменение концентраций растворов контролировали спектрофотометрически.

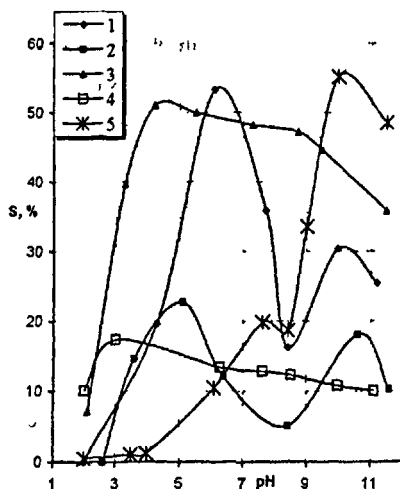


Рис. 4. Зависимость степени сорбции S веществ на волосы от pH раствора 1- AMI, 2 - LEV, 3 - ANF, 4- AMZ, 5- DIF

Как видно из рисунка, максимальная степень сорбции AMI, ANF, LEV и AMZ достигается при значениях pH 3 - 6, а кривые сорбции amitриптилина и левомепромазина имеют вторичные максимумы при pH ~10. Такие результаты могут быть объяснены влиянием нескольких факторов. Во-первых, в слабокислой области вероятность возникновения водородных связей между аминокислотами волоса и модельными препаратами выше, что приводит к увеличению степени сорбции. Во-вторых, известно, что амфолиты в области значений pH, близких к изоэлектрической точке (p_i), достигают предельных значений своих некоторых свойств (склонности к набуханию, растворимости и пр). Для волос $p_i \sim 4$, то есть волосы обладают максимальной способностью сорбировать вещества из растворов в слабокислой области. С другой точки зрения, процесс сорбции модельных соединений можно рассматривать как взаимодействие оснований (третичных аминов) с кислотой (волосами). В таком случае, степень сорбции веществ из слабокислых растворов будет зависеть от их pK_a . Из литературных источников известно, что наиболее сильными основаниями являются представители класса ТЦА, а наиболее слабыми основными свойствами обладает DIF. При сорбции соединений из слабокислых растворов это является определяющим фактором. При значениях pH растворов > 7 самым сильным основанием является гидроксид-ион, что приводит к уменьшению степени сорбции AMI, ANF, LEV и AMZ. В щелочных растворах, скорее всего, основное влияние на степень сорбции оказывает растворимость со-

единений - чем меньше соединение растворимо в воде, тем сильнее его сродство к волосам. Этим объясняется наличие вторых максимумов на зависимостях сорбции от pH для AMI и LEV, а также рост степени сорбции DIF. Зависимость степени сорбции от времени контакта волос с растворами веществ была изучена при установленных оптимальных значениях pH. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

*Степень сорбции (%) лекарственных препаратов из водных растворов
на волосы*

Вещество	pH раствора	Время сорбции, час					
		3	5	20	24	48	96
AMI	6.0	21.5 ± 0.1	28.1 ± 0.1	38.5 ± 0.4	44.7 ± 0.6	53.6 ± 0.4	53.1 ± 0.1
ANF	4.0	19.7 ± 0.5	33.7 ± 0.6	40.4 ± 0.3	44.9 ± 0.5	50.8 ± 0.8	52.2 ± 0.1
AMZ	3.0	1.5 ± 0.1	6.6 ± 0.1	9.3 ± 0.2	11.1 ± 0.1	17.7 ± 0.3	17.9 ± 0.3
LEV	5.0	1.1 ± 0.1	7.5 ± 0.3	13.5 ± 0.4	15.7 ± 0.2	23.1 ± 0.1	23.3 ± 0.1
DIF	10.0	22.7 ± 0.5	28.7 ± 0.2	49.1 ± 0.1	56.3 ± 0.1	56.3 ± 0.2	56.2 ± 0.1

Из таблицы видно, что соединения каждого класса имеют очень близкие характеристики процесса сорбции (степень и кинетика сорбции). Исходя из полученных экспериментальных данных, был сделан вывод о том, что трициклические антидепрессанты (AMI и ANF) являются менее полярными соединениями и более сильными основаниями, чем нейролептики (LEV и AMZ). На основании результатов, полученных ранее при изучении экстракции, нами было сделано предположение, что DIF обладает наименьшей полярностью среди выбранных модельных препаратов. Это подтверждают результаты изучения сорбции: у дифенгидрамина отмечена самая высокая степень сорбции, к тому же максимальная степень сорбции в этом случае достигается не за 48 часов, как у остальных соединений, а за сутки.

Сравнивая степень сорбции ПАУ из сигаретного дыма (5 - 6 %) и лекарственных препаратов из растворов (20 - 50 %), следует сделать вывод о большей эффективности последнего способа. Степень сорбции ксенобиотиков из растворов превышает таковую из газовой фазы в 4 - 10 раз. Это объясняется тем, что вода спо-

способствует набуханию протеиновой сетки волоса и проникновению веществ в ее структуру.

Было рассчитано количество модельных соединений, эндогенно связанных с матрицей волос. Установлено, что распределение внутреннего и внешнего загрязнений различно для ТЦА и нейролептиков. Несмотря на то, что максимальная степень сорбции из раствора наблюдается именно для DIF, AMI и ANF (табл. 3), рассчитанное эндогенное загрязнение оказалось выше для LEV и AMZ. Это говорит о том, что полярные соединения образуют более прочные связи с белковой матрицей. Такое предположение подтверждают и данные, полученные при исследовании сорбции ПАУ на волосы; в ходе первых суток после обработки волос дымом трехкратное мытье образцов раствором додецилсульфата натрия удаляет 100 % сорбированных углеводов. Интересен тот факт, что полярность соединений влияет и на эффективность промывки образцов для удаления неполярных ПАУ достаточно 3-кратного промывания, ТЦА и дифенгидрамин удаляются с поверхности волос за четыре раза, а для удаления нейролептиков требуется вымыть образцы пять раз. Приготовленные модельные образцы волос использовали для выбора условий извлечения лекарственных препаратов из белковой матрицы.

Выбор условий извлечения лекарственных препаратов из матрицы волос

Важнейший этап при анализе волос на содержание органических соединений - извлечение этих соединений из белковой структуры (матрицы) волоса. Здесь существует две проблемы: 1) неполное извлечение веществ из структуры волоса и 2) полное либо частичное разложение веществ в ходе процесса. Заведомо полностью соединения извлекаются при переводе волосяной матрицы в раствор в достаточно жестких условиях (например, при нагревании навески волос в растворе щелочи). При использовании более «мягких» условий извлечения не существует доказательств полного перехода инородных органических соединений из матрицы в раствор, поскольку матрица волоса разрушается лишь частично. Ранее предложенный нами способ извлечения ПАУ из структуры волос оказался неприменим для решения текущей задачи. В ходе работы нами было сделано следующее предположение: степень разложения веществ при извлечении их из структуры волоса (анализ приготовленных модельных образцов) ниже, чем при проведении контрольного опыта (раствор с внешней добавкой искомым соединений). Это объясняется тем,

что в ходе извлечения эндогенных включений большая их часть экранирована белковыми цепями волоса. В контрольном опыте подобная «защита» веществ сводится к минимуму и, соответственно, возрастает их неустойчивость к воздействию агрессивных сред. Необходимо было решить обе выделенные проблемы, т.е. добиться сочетания максимального разрушения матрицы волос с минимальными потерями веществ из-за их разложения в жестких условиях. В качестве матричных растворителей были использованы 0.5 М NaOH, 3 М и 1 М KOH, концентрированная H_2SO_4 (96 %) и концентрированный раствор NH_3 (25 %). Масса навесок волос не превышала 300 мг. В ходе контрольных опытов нами было установлено, что вещества, принадлежащие к классу нейролептиков, и дифенгидрамин более устойчивы в агрессивных средах, чем трициклические антидепрессанты. Было также выявлено, что устойчивость веществ напрямую связана с временем обработки раствора. Например, при использовании 1 М KOH в ходе первых тридцати минут вещества не образуют метаболитов и извлекаются из раствора на 80 - 90 %. Однако, в таком случае, структура волос остается почти не затронутой, что опять приводит к вопросу о полноте извлечения ксенобиотиков из матрицы. Заметное разрушение волос начинается после 1.5 часов обработки, но, вместе с тем, увеличивается степень разложения самих анализов. Наиболее «мягким» и относительно быстрым оказался способ, основанный на использовании концентрированного раствора аммиака в качестве «матричного растворителя». Перед окончанием УЗ-обработки в вытяжку необходимо добавлять 5 М KOH (в соотношении 1:8) для максимального разрушения матрицы волос. Следует отметить, что при этом способе разложения наблюдается наибольшая устойчивость всех изучаемых соединений. Перед проведением микроэкстракции следует подкислить раствор несколькими каплями концентрированной H_2SO_4 до исчезновения мути в вытяжке. Это необходимо для снижения растворимости гексана в водной фазе. Как показали эксперименты, раствор волос в щелочи не пригоден для дальнейшей микроэкстракции, так как гексан образует с вытяжкой стойкую эмульсию, при этом потери экстрагента превышают 75 %. К тому же, количество собранного экстракта является невоспроизводимым от опыта к опыту. Таким образом, матричный эффект, в случае щелочного разложения, оказывает существенное влияние на результаты микроэкстракции. После добавления серной кислоты к полученному матричному раствору, из исходных 200 мкл гекса-

на после экстракции удастся собрать 170 - 190 мкл, что делает потери органической фазы незначительными. Таким образом, нами было проверено соотношение «устойчивость соединений - степень разложения волос» для различных способов обработки волос. Степень извлечения эндогенных соединений из приготовленных ранее модельных образцов была определена для трех наиболее удачных способов (табл. 4)

Таблица 4

Сравнение различных способов извлечения эндогенно связанных соединений из модельных образцов волос. Объемы «матричных растворителей» указаны на 100мг волос (n = 3, P = 0.95)

Условия извлечения	Вещество	AMI	ANF	LEV	AMZ	DIF
4 мл 1 М КОН, 37 ⁰ С, УЗ 120 мин	Степень извлечения, %	81 ± 4	86 ± 4	61 ± 4	71 ± 3	81 ± 5
H ₂ SO ₄ конц, 5 М КОН (по каплям, до pH 10)		39 ± 5	37 ± 7	32 ± 11	25 ± 9	46 ± 9
4 мл NH ₃ конц., 40 ⁰ С, УЗ 30 мин, 0.5 мл 5 М КОН		88 ± 3	90 ± 4	81 ± 5	84 ± 6	92 ± 5

Как видно из таблицы, наибольшая степень извлечения всех соединений достигается при использовании в качестве «матричного растворителя» концентрированного водного раствора аммиака с последующим добавлением раствора гидроксида калия. Следует отметить, что степень извлечения ТЦА и дифенгидрамина во всех трех случаях несколько выше, чем нейролептиков. Это можно объяснить тем, что более полярные соединения - левомепромазин и аминазин - связываются со структурой волос более прочно, чем менее полярные. Таким образом, полярность органических молекул препятствует их включению в волос, однако увеличивает степень удерживания соединений в структуре. Кроме того, полученные данные подтверждают наше предположение о большей устойчивости эндогенных включений по сравнению с экзогенными.

Разработанный нами способ определения ряда лекарственных препаратов в волосах состоит из следующих этапов (объемы растворителей указаны для массы образца волос 100 мг):

- измельчение пробы и взвешивание,
- обработка навески волос концентрированным раствором аммиака (~ 4 мл) в УЗ-ванне при 40 °С,
- добавление в вытяжку 5 М КОН (~ 0.5 мл) при помешивании,
- добавление к раствору по каплям концентрированной H_2SO_4 (до исчезновения мути), с тем, чтобы pH раствора был не ниже 9-10,
- перенос вытяжки в микроэкстрактор и экстракция гексаном,
- перенос всего объема экстракта (~ 200 мкл) в тонкий слой и элюирование в системе гексан - ацетон - хлороформ - ТБА (2:2:2:0.2),
- сканирование пластины на денситометре «Самэг»,
- обработка полученных результатов.

Определение изученных ксенобиотиков в реальных образцах волос

Используя разработанный в настоящей работе способ извлечения, мы провели определение ПАУ в волосах шестнадцати курящих и некурящих добровольцев методом ВЭТСХ. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5

Количество ПАУ в волосах курящих и некурящих людей

№ п/п	Пол	Возраст, лет	Навеска волос, мг	Количество сигарет в день, шт.	Общее количество ПАУ в волосах, нг/г волос
1	М	25	150	20 – 25	90
2	М	25	220	10 – 15	5
3	Ж	16	500	0	нет
4	М	24	160	15 – 20	300
5	Ж	54	110	20 – 30	20
6	М	23	250	0	нет
7	Ж	23	150	20 – 25	100
8	Ж	23	400	0	нет
9	Ж	29	360	10 – 20	40

10	М	26	160	20 – 25	80
11	Ж	23	140	10 – 20	200
12	М	40	150	20 – 30	10
13	М	21	130	7 – 15	300
14	Ж	65	100	3 – 8	50
15	М	47	120	15 – 25	200
16	М	33	120	10 – 20	80

нет – отрицательный результат

Нами не была выявлена зависимость содержания в волосах эндогенных полиароматических углеводородов от количества выкуриваемых сигарет, пола и возраста курильщика. Установлено, что в волосах некурящих людей, часто подвергающихся внешнему воздействию дыма сигарет, количество ПАУ в волосах находится за пределами чувствительности метода (пробы 3, 6, 8 из табл. 5). Обнаружение лекарственных препаратов в волосах людей проводили по представленной в данной работе методике. Если исходная масса образца волос была достаточной (> 300 мг), то подобным образом готовили пробы для сравнительного газохроматографического анализа с МС-детекторованием и поляризационно-флуоресцентного иммуноанализа. Результаты представлены в табл. 6 и 7.

Таблица 6

Определение амитриптилина в волосах пациентов методами

ВЭТСХ, ГХ/МС и ПФИА

№ п/п	Пол	Возраст, лет	Назначенный препарат, доза/сут	Длительность приема на момент отбора пробы	Содержание в волосах, мкг/г		
					Результаты ВЭТСХ	Результаты ГХ/МС	Результаты ПФИА
1	Ж	39	АМИ 100 мг	2,5 мес.	22	да	да
2	Ж	42	АМИ 50 мг	1 мес.	58	да	•
3	М	25	АМИ 25 мг	1 мес.	13	да	•
4	М	33	АМИ 125 мг	2 мес.	2	да	да
5	М	22	АМИ 150 мг	5 мес.	26	•	да

Определение лекарственных препаратов в волосах пациентов методами

ВЭТСХ и ГХ/МС

№ п/п	Пол	Возраст, лет	Назначенный препарат, доза/сутки	Длительность приема на момент отбора пробы	Результат анализа	
					Результаты ВЭТСХ	Результаты ГХ/МС
1	Ж	39	CLO 50 мг	2.5 мес.	да	да
2	Ж	48	CLO 50 мг	Неизвестно	да	да
3	Ж	23	CLO 50 мг	2 нед.	да	да
4	Ж	47	CLO 50 мг	2 мес.	да	*
5	Ж	40	CLO 50 мг	1 мес.	да	*
6	Ж	26	AMZ 25 мг	1 мес.	да	*
7	Ж	26	CLO 25 мг, MAP 100 мг	3 нед.	да	*
8	Ж	66	MAP 75 мг	1.5 мес.	да	*
9	Ж	20	CLO 50 мг	2 нед.	да	да
10	М	27	CLO 125 мг	8 дн.	да	да
11	М	24	MAP 150 мг, SON 100 мг	11 дн.	нет	нет
12	М	35	ANF 125 мг	1.5 мес.	нет	нет
13	М	18	CLO 300 мг	1 мес.	да	*
14	М	32	CLO 100 мг	3 нед.	да	*
15	М	18	SON 30 мг, CLO 15 мг	2 нед.	да	*
16	М	41	MAP 75 мг	2 нед.	да	*
17	М	24	CLO 100 мг	2.5 мес.	да	*
18	М	35	SON 75 мг, MAP 150 мг	2.5 мес.	да	*

да – положительный результат, соединение обнаружено

нет – отрицательный результат

* – анализ не проводился

Из таблиц видно, что взаимосвязь между дневной дозой препарата и его количеством в волосах пациента отсутствует. Подобный результат был получен и в других исследованиях. Независимые методы (ГХ/МС и ПФИА) подтвердили положительные и отрицательные результаты ВЭТСХ-анализа. Таким образом, была

достигнута основная задача скрининга - отсутствие ложноотрицательных результатов

Результаты работы могут быть использованы в организациях, занимающихся фундаментальными исследованиями в области аналитической химии, биохимии, экологии человека, а также в практических целях криминалистики, медицины и при контроле персонала особо важных предприятий

ВЫВОДЫ

1 Изучено экстракционное концентрирование ряда лекарственных препаратов (амитриптилина, анафранила, левомепромазина, аминазина и дифенгидрамина) в системе вода - гексан. Показано, что однократная экстракция при значении $pH \sim 10$ позволяет количественно извлекать изученные соединения в органическую фазу. Установлено, что коэффициенты распределения модельных препаратов практически не зависят от соотношения объемов водной и органической фаз вплоть до значения 50/1, что свидетельствует о принципиальной возможности реализации микрожидкостной экстракции на стадии предварительного концентрирования пробы

2. Изучено поведение модельных соединений в хроматографических системах с различными подвижными и неподвижными фазами. Проведена оптимизация условий разделения и оценка метрологических характеристик группового и внутригруппового определения модельных соединений методом ВЭТСХ. Для группового определения соединений класса ПАУ предложена новая хроматографическая система с подвижной фазой состава гексан-дихлорметан-нитробензол (5/5/0/1)

3 Изучена сорбция соединений класса ПАУ из сигаретного дыма на волосы человека. Установлено, что из газовой фазы сорбируется до 6% от общего количества ПАУ в сигаретном дыме. Для модельных лекарственных препаратов была изучена сорбция из водных растворов и определены оптимальные значения pH , при которых достигается максимальная степень сорбции

4 На основе полученных закономерностей сорбции модельных соединений из газовой фазы и из раствора разработан подход, позволяющий провести оценку соотношения внутреннего (эндогенного) и внешнего (экзогенного) загрязнений на волосах человека. На базе такого подхода предложены способы приго-

товления образцов сравнения для определения органических ксенобиотиков в волосах человека.

5. Изучена эффективность различных способов извлечения органических веществ из белковой матрицы волос. Для модельных соединений определены количественные характеристики извлечения. На основе полученных результатов предложены новые способы извлечения полярных и неполярных органических ксенобиотиков из волос человека.

6. Разработаны методики скрининга лекарственных препаратов и ПАУ в волосах человека на основе сочетания микрожидкостной экстракции и высокоэффективной тонкослойной хроматографии. Методики апробированы при анализе реальных образцов волос курильщиков и пациентов психиатрических клиник. Положительные и отрицательные результаты ВЭТСХ-анализа подтверждены независимыми методами (ГХ/МС и ПФИА).

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

1. Marutsenko I.V., Borzenko A.G., Kletschina E.V., Kiselev S.M., Revelsky A.I., Polenova T.V., Revelsky I.A. Large volume sample injection in HPTLC and ultratrace analysis. / International Congress on Analytical Chemistry. Moscow. Russia. 1997. June 15-21. P. E-71.

2. Marutsenko I.V., Revelsky I.A., Borzenko A.G., Kletschina E.V., Polenova T.V., Glazkov I.N. Fast screening of personnel for drugs of abuse and related compounds based on HPTLC analysis of hair. / PITTCO'98. New Orleans. Louisiana. US. 1998. March 1-5. P. 1673.

3. Marutsenko I.V., Polenova T.V., Revelsky I.A., Borzenko A.G., Glazkov I.N. Determination of psychotropic drugs in human hair by HPTLC. / Balaton Symposium'99 on High-Performance Separation Methods. Siófok. Hungary. 1999. September 1 - 3. P. 158.

4. Marutsenko I.V., Polenova T.V., Virus E.D., Borzenko A.G., Revelsky I.A. HPTLC determination of polyaromatic hydrocarbons in smokers' hair. / International Symposium on Planar Separation. Lillafured. Hungary. 2001. June 23 - 25. P. 301 - 308.

5. Polenova T.V., Borzenko A.G., Marutsenko I.V., Revelsky I.A. Screening of the psychotropic drugs in hair based on coupling HPTLC and microliquid extraction. // J. of Chromatographic Sci. 2001. V. 39. P. 293 - 296.

6 IV. Marutsenko, T.V. Polenova, E D Virus, A G Borzenko, I A Revelsky
HPTLC determination of polyaromatic hydrocarbons in smokers' hair // J Planar
Chromatogr 2001 V 14 P. 330-333

7 Поленова Т В , Маруценко И В , Борзенко А Г, Ревельский И А Скрининг
психотропных препаратов в волосах человека, основанный на сочетании микро-
жидкостной экстракции и высокоэффективной хроматографии / Журн Аналит.
Хим 2003 Т. 58 С. 633

8 В Н Калиниченко, Т.В. Поленова, И В Маруценко Полиэтиленгликолевые
эфирь хитозана / VIII Международная научно-практическая конференция «Кос-
метические средства и сырье безопасность и эффективность» Москва Россия.
2003. Ноябрь 10-12.

9 Т.В. Поленова, И В Маруценко, В Н Калиниченко Исследование защит-
ных функций полиэтиленгликолевых эфиров хитозана // Сырье и упаковка для
парфюмерии, косметики и бытовой химии 2004 Т 40 С. 34 - 36

Отпечатано на ризографе
в ОНТИ ГЕОХИ РАН
Тираж 100 экз.

#11886