

А. С. Анацкая, И. П. Ремезова

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ВолгГМУ, Россия,
кафедра токсикологической и аналитической химии

ДИАГНОСТИКА ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЙ АЛИМЕМАЗИНОМ МЕТОДОМ ГХ/МС ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

УДК 615.214.21

В рамках настоящего исследования осуществлена разработка методики обнаружения алимемазина и основных его метаболитов в биологических жидкостях лабораторных животных с помощью метода ГХ/МС. Предположены следующие пути метаболизма алимемазина: деметилирование молекулы алимемазина, в результате которого образуется метаболит М₁, далее происходит ряд реакций деметилирования, в ходе которых образуется метаболит М₂. Одним из возможных путей метаболизма является окисление атома серы с образованием метаболита М₃. Возможно также образование метаболита М₄ в результате реакции гидроксирования с формированием 3-гидроксиалимемазина. Также возможно образование конъюгатов с уксусной кислотой: М₅, М₆, М₇. В извлечениях из мочи и плазмы с терапевтической концентрацией алимемазина идентифицированы все описанные выше метаболиты, в плазме с токсической концентрацией – метаболиты М₂, М₅, М₆. Достоверное подтверждение острого отравления алимемазином можно доказать по отсутствию в извлечении из плазмы крови метаболитов М₁, М₃, М₄, М₇. Данная методика может быть включена в схему химико-токсикологического анализа алимемазина.

Ключевые слова: алимемазин, ГХ/МС, химико-токсикологический анализ

A. S. Anatskaya, I. P. Remezova

DIAGNOSTICS OF ACUTE POISONING OF ALIMEMAZINE BY GC/MS METHOD DURING CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL STUDIES OF BIOLOGICAL FLUIDS OF LABORATORY ANIMALS

Within the framework of this study, a method was developed for the detection of alimemazine and its main metabolites in biological fluids of laboratory animals using the GC / MS method. The following pathways of alimemazine metabolism have been suggested: demethylation of the alimemazine molecule, which results in the formation of the M₁ metabolite, followed by a series of demethylation reactions, during which the M₂ metabolite is formed. One of the possible metabolic pathways is the oxidation of the sulfur atom with the formation of the M₃ metabolite. The formation of the M₄ metabolite is also possible as a result of the hydroxylation reaction with the formation of 3-hydroxyalimemazine. The formation of conjugates with acetic acid is also possible: M₅, M₆, M₇. In extracts from urine and plasma with a therapeutic concentration of alimemazine, all the metabolites described above were identified, in plasma with a toxic concentration – metabolites M₂, M₅, M₆. A reliable confirmation of acute poisoning with alimemazine can be proved by the absence of metabolites M₁, M₃, M₄, M₇ in the extraction from blood plasma. This technique can be included in the scheme of chemical-toxicological analysis of alimemazine.

Key words: alimemazine, GC/MS, chemical-toxicological analysis.

Алимемазин (торговое название «Тералиджен», «Терален») – антипсихотическое средство, производное фенотиазина, применяющееся для лечения заболеваний нервной системы. В связи с довольно распространенным назначением данного лекарственного препарата участились случаи передозировок им. При анализе данных литературы установлено большое число отравлений алимемазином, в том числе с летальным исходом [4– 8]. Клиническими проявлениями отравлений являются следующие признаки: экстрапирамидные расстройства (тремор, акатизия), повышение судорожной активности (у детей), снижение артериального давления, тахикардия. Симптомы интоксикаций, характерные для алимемазина, имеют довольно схожую клиническую картину отравлений с другими лекарственными препаратами, поэтому для точной постановки диагноза необходимо проведение химико-токсикологического анализа не только по содержанию основного вещества, но и его метаболитам.

В работах зарубежных авторов описаны некоторые основные метаболиты алимемазина: 3-гидрокситримепразин (m/z 314), N – деметилтримепразин (m/z 284), N-деметил-3-гидрокситри-

празин (m/z 284), N-деметил-3-гидрокситри-

мепразин (m/z 300) и сульфоксид тримепразина (m/z 314) [9].

В моче после кислотного гидролиза обнаружены шесть метаболитов алимемазина с молекулярными массами 199, 257, 356, 326, 312, 384 а. е. м., большинство из них были ацетилированными продуктами [10].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработать способы обнаружения алимемазина и его основных метаболитов в биологических жидкостях с помощью метода ГХ/МС для установления факта острого отравления.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для осуществления экспериментального исследования использовали суспензию из таблеток «Тералиджен» с дозировкой действующего вещества – 5 мг (производство: Фармацевтическое Акционерное общество «Хаузянг», Вьетнам), стандартные образцы субстанции алимемазина (Sigma – Aldrich, каталожный номер 32113 – 10 MG) и основных метаболитов: 3-гидрокситримепразин (LGC Standards, каталожный номер **TLCI-113-10MG**), N-диметилтримепразин (LGC Standards, каталожный номер **TLC-E-207-10MG**), **N-диметил-3-гидрокситримепразин** (LGC Standards, каталожный номер **TLCT-711-10MG**), **сульфоксид тримепразина** (LGC Standards, каталожный номер **TLC-697-10MG**).

Исследование проводили на крысах обоего пола линии Wistar средней массой 200 г. Животным с помощью зонда перорально вводили суспензию алимемазина с терапевтической и токсической концентрацией действующего вещества [2]. Параллельно был проведен контрольный опыт. После чего, через различные промежутки времени (15, 30 минут, 1, 2, 3 часа),

животных вводили в наркоз, декапитировали и осуществляли у них забор плазмы крови. Сбор мочи проводили в тех же временных интервалах. Контрольной группе животных алимемазин не вводили.

Для изолирования алимемазина из мочи и плазмы крови использовали описанные ранее методики [2] с учетом факторов экстракции [3].

Обнаружение алимемазина и его метаболитов проводили методом ТСХ. Растворы извлечений из мочи и плазмы крови, а также раствор стандартного образца алимемазина наносили на хроматографическую пластину «Сорбфил».

Процесс разделения веществ осуществляли с использованием ранее выбранной системы: 25%-й раствор аммиака – этанол (1 : 1) – этилацетат – ацетон (4 : 90 : 45) [1]. Детектирование проводили УФ-светом. Неидентифицированные пятна элюировали с пластины в 96%-м спирте и анализировали методом ГХ/МС.

Анализ полученных извлечений методом ГХ/МС проводили на газовом хроматографе Maestro 7820 с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5973 N.

Работа была осуществлена на базе химикотоксикологической лаборатории ГБУЗ «Наркологический диспансер» МЗ Краснодарского края (табл. 1). Ввод пробы проводился автоматически.

Работа масс-селективного детектора проводилась в режиме электронного удара (70 эВ). Сигнал регистрировали по полному ионному току. Диапазон масс-сканируемых ионов 40–540 а. е. м.

Идентификацию веществ осуществляли по характерным временам удерживания и совпадению масс-спектров веществ с библиотечными и со стандартными образцами.

Таблица 1

Хроматографические условия

Показатель	Условия
Колонка	Кварцевая капиллярная HP-5-1-MS длиной 30 м, с внутренним диаметром 0,25 мм, толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм
Температурная программа колонки	Начальная температура колонки 90 °С, далее подъем температуры со скоростью 15 °С/мин до 280 °С
Газ-носитель	Гелий
Скорость потока газа-носителя	1,10 мл/мин с задержкой на растворитель в 3 мин
Температура инжектора	260 °С
Температура детектора	280 °С
Скорость потока: воздуха водорода поддувочного газа	400 мл/мин 40 мл/мин 30 мл/мин
Объем вводимой пробы	1 мкл

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении анализа методом ТСХ на хроматографических пластинах, помимо пятен основного вещества, наблюдались дополнительные пятна, которые были исследованы. Для этого нами была проведено снятие слоя силикагеля с дополнительного пятна. После чего его растворяли в 96%-м спирте, полученный раствор подвергали фильтрованию через бумажный фильтр «синяя лента». Подтверждение

присутствия алимемазина в извлечениях из мочи и плазмы проводили методом ГХ/МС.

Полученные хроматограммы представлены на рис. 1–3.

На полученных хроматограммах имеется пик большой интенсивности со временем удерживания 13,52 минуты, который совпадает по времени удерживания с пиком алимемазина в растворе стандартного образца.

Масс-спектры извлечений из мочи и плазмы представлены на рис. 4–6.

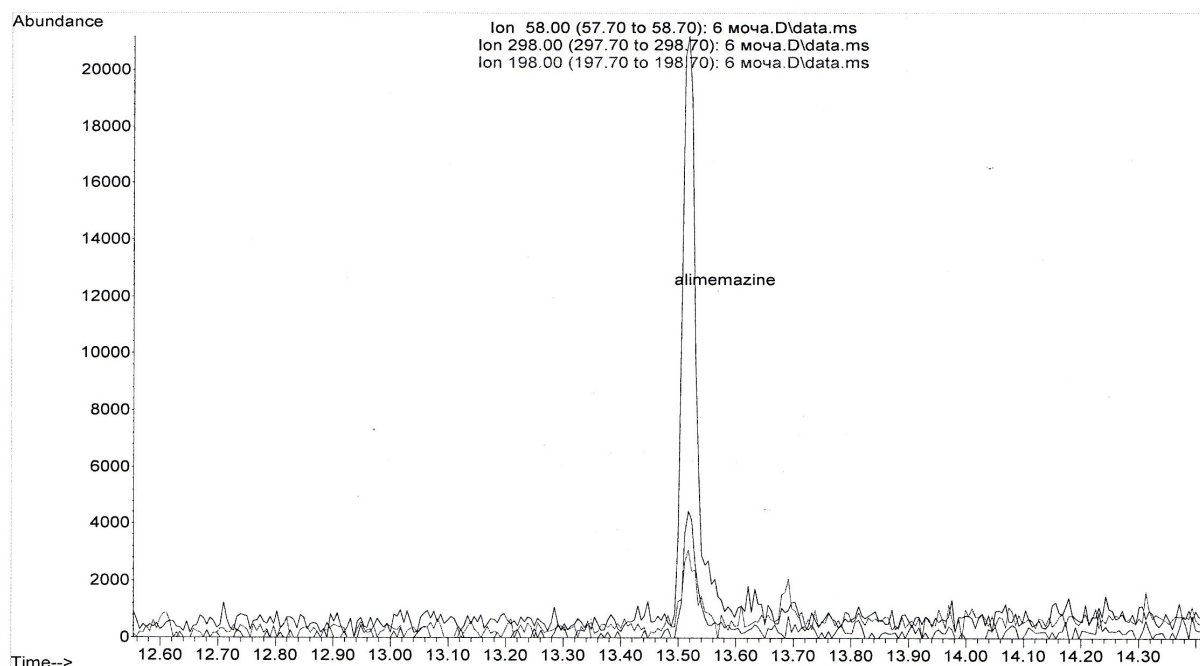


Рис. 1. Хроматограмма извлечения из мочи с терапевтической дозой алимемазина (3 часа)

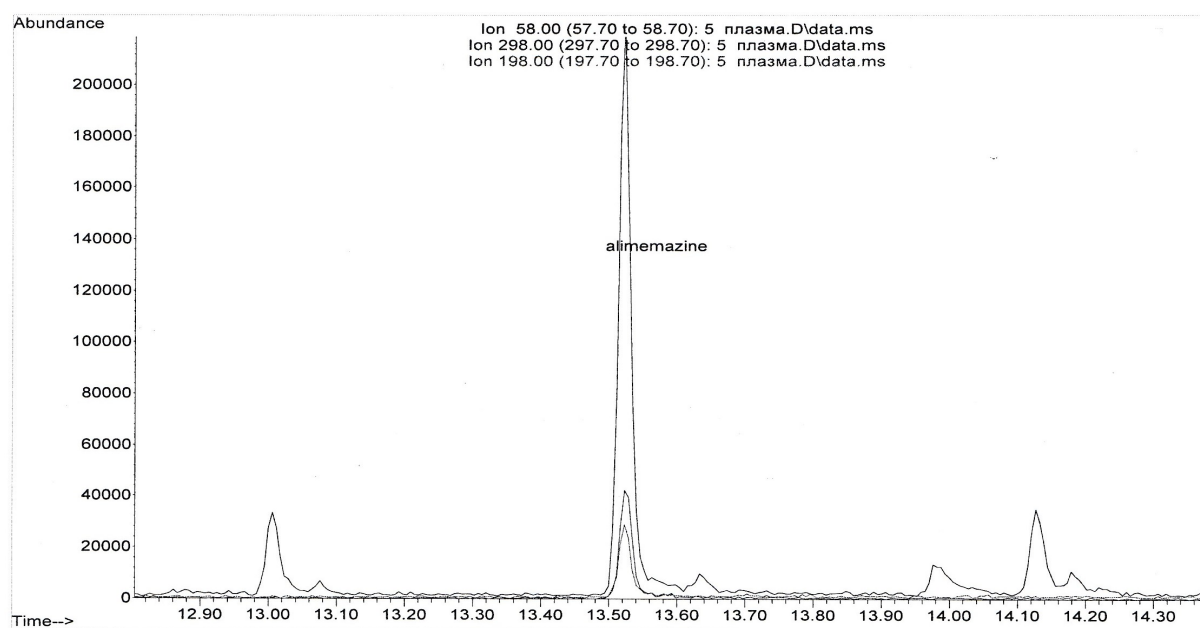


Рис. 2. Хроматограмма извлечения из плазмы с терапевтической дозой алимемазина (2 часа)

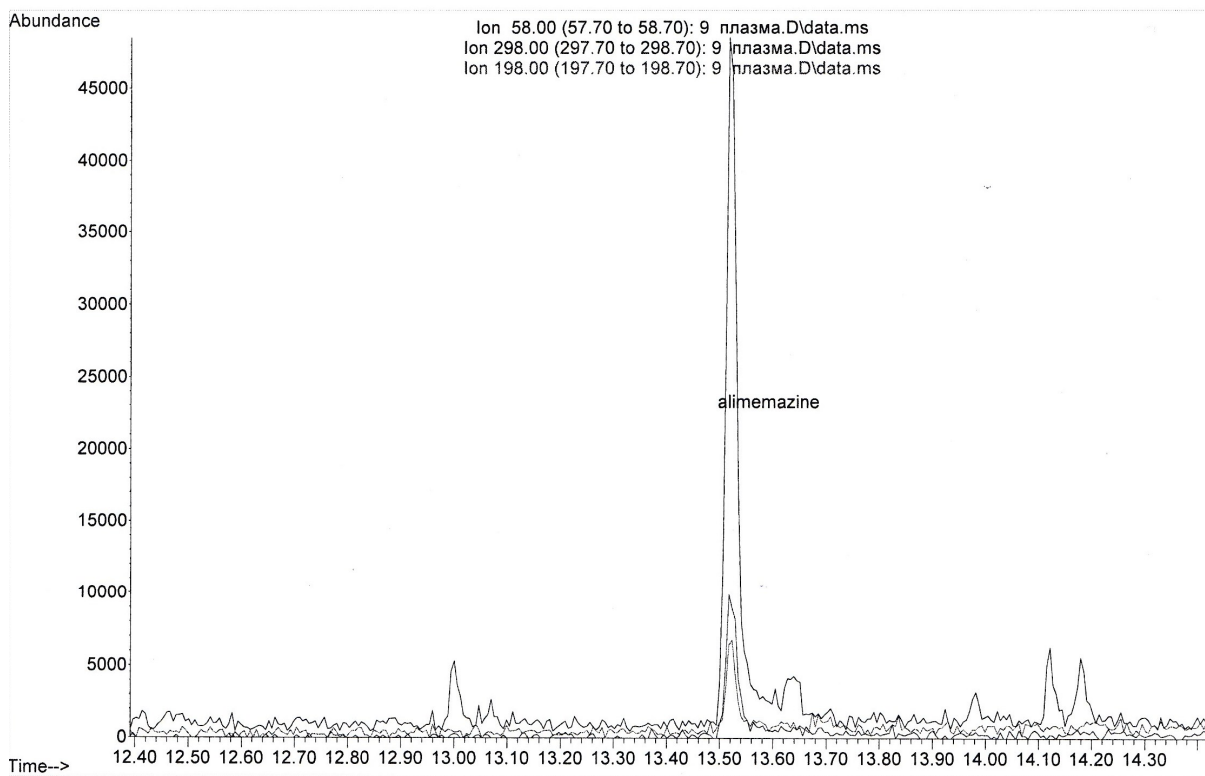


Рис. 3. Хроматограмма извлечения из плазмы с токсической дозой алимемазина (1 час)

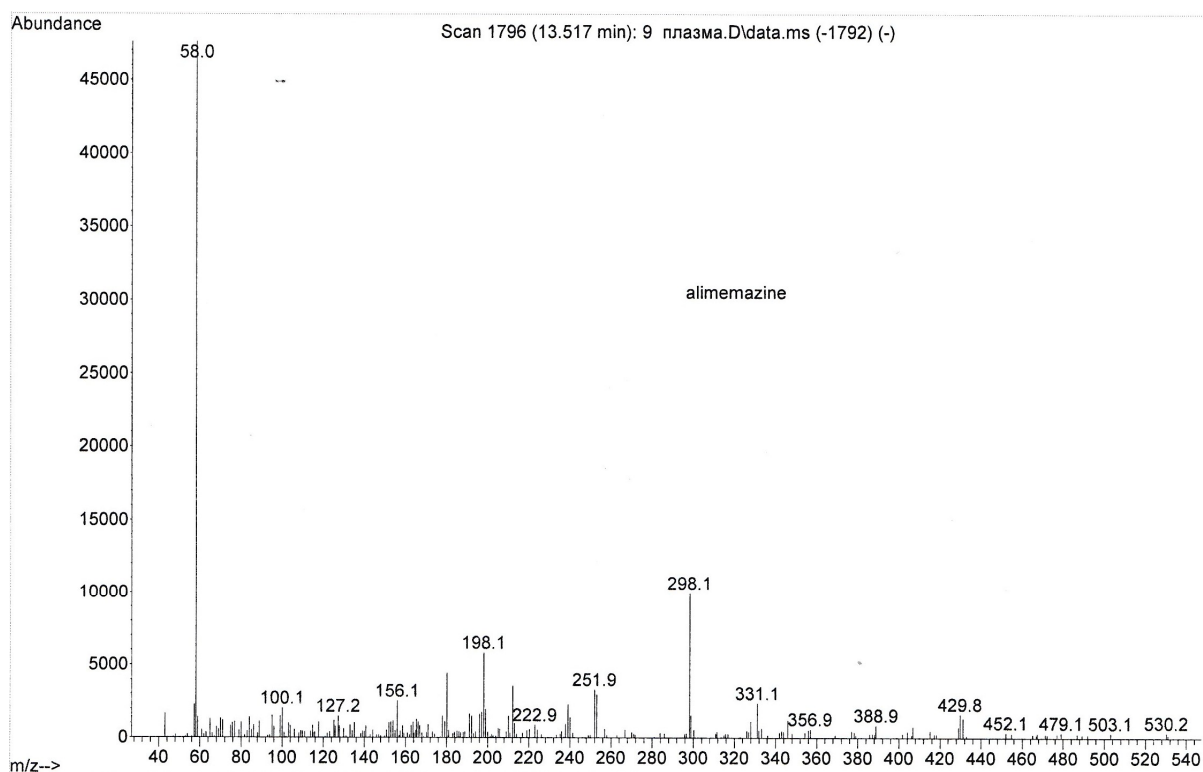


Рис. 4. Масс-спектр извлечения из мочи с терапевтической дозой алимемазина (3 часа)

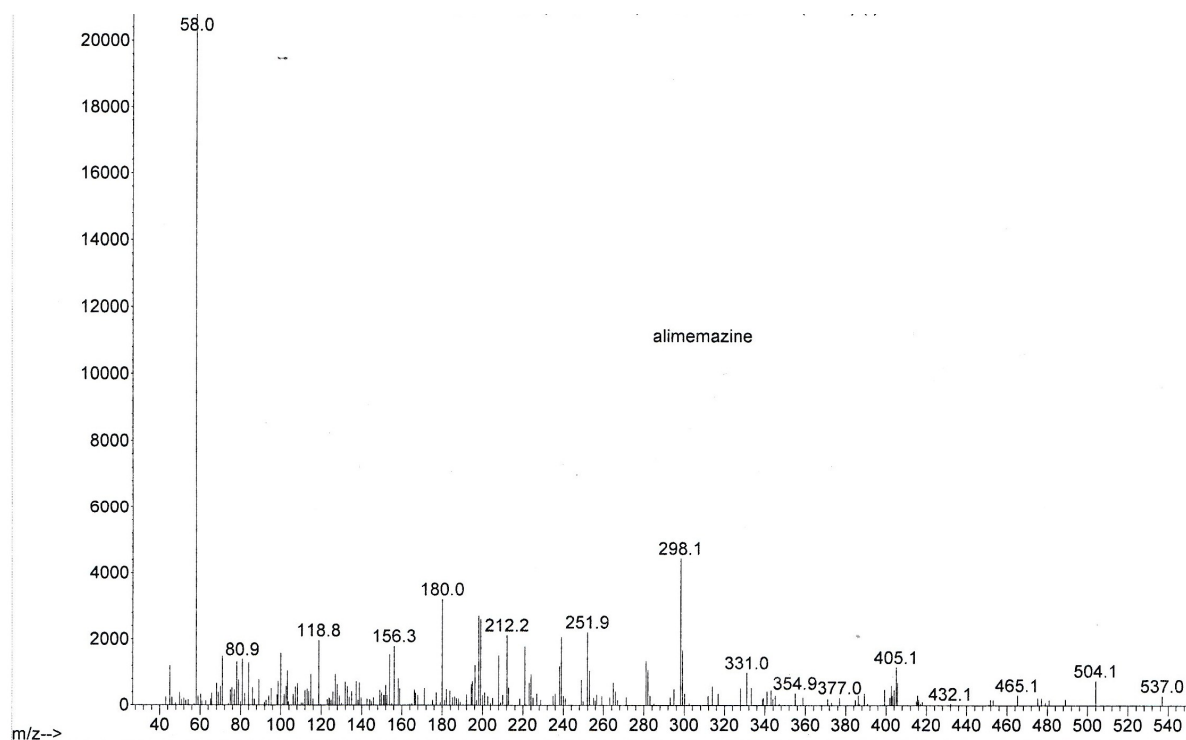


Рис. 5. Масс-спектр извлечения из плазмы с терапевтической дозой алимемазина (2 часа)

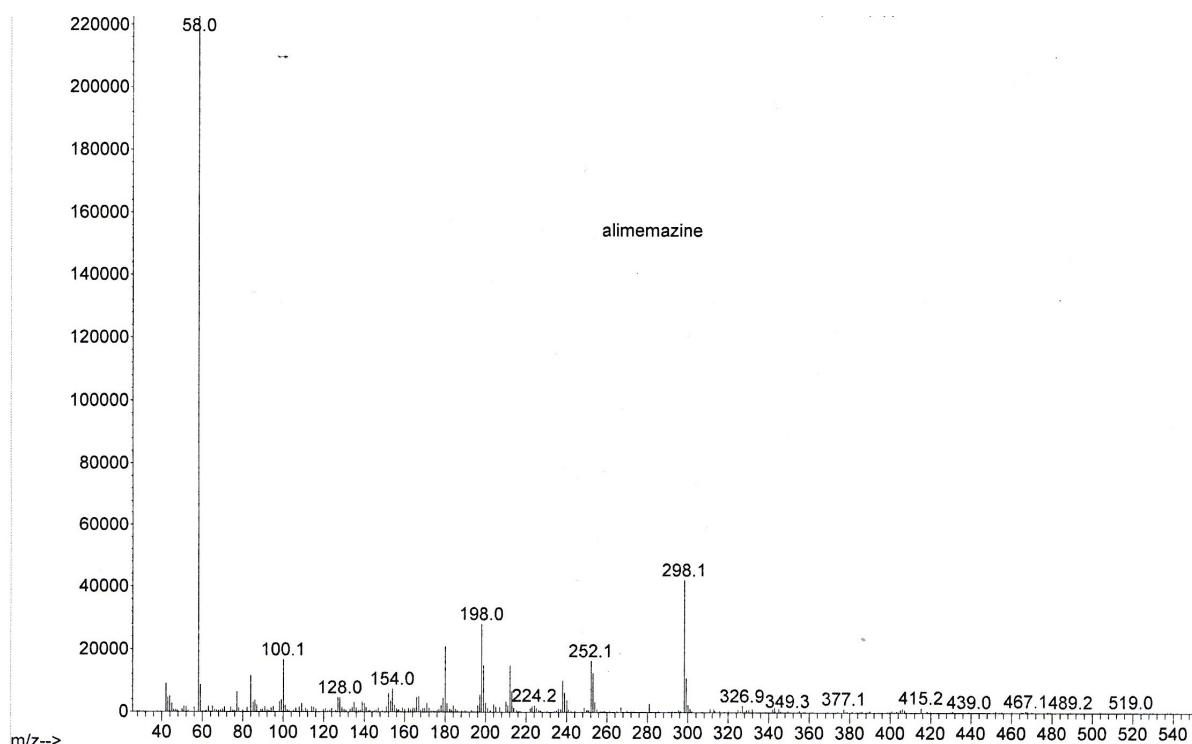


Рис. 6. Масс-спектр извлечения из плазмы с токсической дозой алимемазина (1 час)

На масс-спектрах извлечений присутствовал выраженный пик молекулярного иона алимемазина (m/z 298).

Максимальное количество алимемазина в извлечении из плазмы крови обнаруживалось

через 2 часа после введения лабораторным животным суспензии с терапевтической дозой алимемазина и через 1 час – при введении токсической дозы. В моче лабораторных животных максимальная концентрация алимемазина наблюдалась

спустя 3 часа после перорального введения суспензии алимемазина.

Далее в масс-спектрах извлечений из плазмы и мочи были выделены все не идентифицированные молекулярные ионы. На основании возможных реакций метаболизма нами идентифицированы предполагаемые метаболиты по их молекулярным ионам. Идентификация веществ с одинаковыми молекулярными ионами сопоставлена со структурой по дефрагментации молекулярного иона.

В результате анализа нами была установлена структура 7 метаболитов в извлечениях из мочи и плазмы лабораторных животных. Таким образом, можно предположить следующие пути метаболизма алимемазина: деметилирование

молекулы алимемазина, в результате которого образуется ион m/z 255 (M_1), далее происходит ряд реакций деметилирования, в ходе которых образуется метаболит M_2 (m/z 199). Одним из возможных путей метаболизма является окисление атома серы с образованием метаболита M_3 (m/z 314).

Возможно также образование метаболита M_4 в результате реакции гидроксирования с формированием 3-гидроксиалимемазина с Mg 314 г/моль. Также возможно образование конъюгатов с уксусной кислотой: M_5 (m/z 326), M_6 (m/z 357), M_7 (m/z 385).

Обнаруженные метаболиты проявляются в биологических жидкостях в различные промежутки времени (табл. 2).

Таблица 2

Идентификация метаболитов алимемазина в моче и плазме в зависимости от времени

Время обнаружения	Характеристический ион	Полученные данные	Данные литературы
1	2	3	4
Моча с терапевтической дозой алимемазина			
30 минут	m/z 312,8 m/z 252,9	M_3/M_4 M_1	M_3/M_4 ^[6,11] M_1 ^[11]
1 час	m/z 327,7 m/z 357,3 m/z 382,9	M_5 M_6 M_7	M_5 ^[11] M_6 ^[11] M_7 ^[6,11]
3 часа	m/z 313 m/z 384,9 m/z 253,9	M_3/M_4 M_7 M_1	M_3/M_4 ^[6,11] M_7 ^[6,11] M_1 ^[11]
Плазма с терапевтической дозой алимемазина			
15 минут	m/z 324,9	M_5	M_5 ^[11]
30 минут	m/z 198	M_1	M_1 ^[11]
1 час	m/z 253	M_1	M_1 ^[11]
2 часа	m/z 198 m/z 326,9	M_2 M_5	M_2 ^[11] M_5 ^[11]
Плазма с токсической дозой алимемазина			
15 минут	m/z 198	M_2	M_2 ^[11]
30 минут	m/z 198 m/z 326,9 m/z 355,8	M_2 M_5 M_6	M_2 ^[11] M_5 ^[11] M_6 ^[11]
1 час	m/z 198,1 m/z 356,9	M_2 M_6	M_2 ^[11] M_6 ^[11]
2 часа	m/z 198,1	M_2	M_2 ^[11]
3 часа	m/z 198,1	M_2	M_2 ^[11]

Таким образом, в извлечениях из мочи и плазмы с терапевтической концентрацией алимемазина идентифицированы все описанные выше метаболиты, в плазме с токсической концентрацией – метаболиты M_2 , M_5 , M_6 . Достоверное подтверждение острого отравления алимемазином можно доказать по отсутствию в извлечении из плазмы крови метаболитов M_1 , M_3 , M_4 , M_7 .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика обнаружения алимемазина и его метаболитов в биологических жидкостях (моча, плазма крови) лабораторных животных, проведен анализ полученных извлечений методом ГХ/МС.

Данная методика анализа рекомендована для экспресс-диагностики отравлений алимемазином.

ЛИТЕРАТУРА

1. Обнаружение алимемазина в вещественных доказательствах небиологического происхождения. – Текст : непосредственный / А. С. Рыбасова, Д. Ю. Санжиева, А. С. Карсаева [и др.] // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : сб. науч. трудов. – 2016. – № 71. – С. 180 – 183.
2. Разработка методик изолирования, обнаружения и количественного определения алимемазина в биологических жидкостях лабораторных животных при острых отравлениях. – Текст : непосредственный / А. С. Рыбасова, И. П. Ремезова, Д. А. Любченко [и др.] // Судебно-медицинская экспертиза. – 2019. – № 62 (1). – С. 31 – 35.
3. **Рыбасова, А. С.** Изучение влияния некоторых факторов экстракции на изолирование алимемазина из растворов. – Текст : непосредственный / А. С. Рыбасова // Актуальные направления фундаментальных и прикладных исследований. – 2016. – № 3. – С. 174 – 177.
4. A Fatal case of alimemazine poisoning. – Direct text / F. Kintz, F. Berthault, A. Tracqui, P. Mangin // Journal of analytical toxicology. – 1995. – № 7. – P. 591 – 594.
5. Alimemazine poisoning as evidence of Munchausen syndrome by proxy: A pediatric case report. – Direct text / I. Gomila, V. López-Corominas, M. Pellegrini [et al.] // Forensic Science International. – 2016. – P. 18 – 22.
6. **Bonner, L.** Newer antihistamines can cause adverse reactions in children – Direct text / L. Bonner // Pharmacy today. – 2016. – № 7. – P. 33.
7. **Harling, D. W.** Trimeprazine tartrate and convulsions. – Direct text / D. W. Harling // Anaesthesia. – 1995. – № 50 (1). – P. 97 – 98.
8. **Kahn, A.** Possible role of phenothiazines in sudden infant death. – Direct text / A. Kahn, D. Blum // Lancet. – 1979. – № 2. – P. 364 – 365.
9. **Kim, T.-J.** Identification of new urinary metabolites of trimeprazine in rats by gas chromatography-mass spectrometry. – Direct text / T.-J. Kim // Journal of chromatography B: biomedical sciences and applications. – 1992. – № 2. – P. 295 – 300.
10. **Maurer, H.** Identification of phenothiazine antihistamines and their metabolites in urine. – Direct text / H. Maurer, K. Pflieger // Archives of toxicology. – 1988. – P. 185 – 191.