



УДК 543.544.3: 543.51

Идентификация и определение производных и продуктов метаболизма банкола методами ГЖХ-МС и ВЭЖХ для целей судебно-химического и токсикологического анализа

Григорьев А.М., Мельник А.А.

ГУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы по Белгородской области», Белгород

Рудакова Л.В.

Воронежская медицинская академия им. Н.Н. Бурденко, Воронеж

Аннотация

Определены хроматографические и спектральные характеристики продуктов гидролиза и последующего окисления бенсультапа (банкол). Предложен и обоснован вариант идентификации получающихся соединений. Разработаны методики изолирования бенсультапа, нерейстоксина, сопутствующих соединений и метаболитов из биологических образцов методом твердофазной экстракции

Ключевые слова: инсектициды, бенсультап, высокоэффективная жидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия, твердофазная экстракция.

The chromatographic and spectral features of the products of hydrolysis and the following oxidation of bancol are determined. The variant of identification of obtained compounds is offered and motivated. Methods of isolation of bancol, 4-dimethylamin-1,3-dithiolan, accompanying compounds and metabolites from biological sample by method of solid-phase extraction is designed

Введение

Данная работа выполнена как теоретическое и практическое обоснование определения производных инсектицида нерейстоксина (4-диметиламино-1,3-дитиолан), III, в биологических объектах. Ряд субстанций, называемых аналогами (прекурсорами) нерейстоксина (бенсультап, картап, тиоциклам, тиосультап) характеризуются легкой гидролизуемостью [1], приводя к образованию действующего компонента – нерейстоксина. Бенсультап (S,S'-[2-(диметиламино)-1,3-пропанедил] ди-бензолтиосульфонат), I, является распространенным средством борьбы с колорадским жуком (*Leptinotarsa decemlineata*) и используется в виде 50%-

ного смачивающегося водой порошка под торговым названием «банкол» (bancol, TI-1671, ruban, victenon, TI-78, ZZ-doricida).

Бенсультап (а следовательно, и сам нереистоксин) проявляют относительно низкую токсичность для млекопитающих. Например, для крыс, доза, приводящая к смерти в 50% случаев (LD_{50}) составляет около 1105 мг/кг при оральном употреблении [2].

Тем не менее, принадлежность перечисленных соединений к группе пестицидов, а также требования судебно-химических и токсикологических исследований приводят к необходимости определения соединений этой группы в биообъектах. Метод ГЖХ-определения нереистоксина (как продукта гидролиза картапа) с использованием набивных колонок и пламенно-ионизационного детектора приведен в работе [3], определение нереистоксина и его метаболитов в плазме крови с применением ГЖХ-МС и варианта твердофазной экстракции рассмотрен авторами [4]. Известное нам русскоязычное руководство [5] по определению бенсультапа (банкола) в агрообъектах никак нельзя считать приемлемым как из-за физико-химических свойств бенсультапа (легкая гидролизуемость и очень низкая растворимость в воде) [1,2], так и из-за выбранного способа анализа (ТСХ). Хотя в данной работе мы рассмотрели и этот вопрос, но основные исследования сосредоточили на определении продукта гидролиза бенсультапа (нереистоксина), сопутствующих ему соединений и метаболитов методами обращенно-фазовой ВЭЖХ и ГЖХ-МС.

Масс-спектры всех рассматриваемых соединений труднодоступны и отсутствуют в библиотеке NIST05, и поэтому мы предприняли ряд попыток по их идентификации. Нереистоксин и тиоциклам (V, найденный в торговом образце банкола) идентифицированы по масс-спектрам, приведенным в базе PMW_TOX2.

Также на основании полученной информации мы разработали способы выделения рассматриваемых соединений из биообъектов методом твердофазной экстракции (ТФЭ).

Эксперимент

ГЖХ-МС. Использовали газовый хроматограф 6890, оснащенный квадрупольным детектором 5375VL, настроенным на возбуждение электронным ударом (70 эВ) фирмы Agilent Technologies. Температуры инжектора и устройства сопряжения хроматографа с детектором составляли 270 и 290°C соответственно, инжектор настраивали на ввод пробы без сброса (splitless). Хроматограммы получали с применением двух кварцевых капиллярных колонок разной полярности; для каждой колонки использовали два градиентных температурных режима: быстрый скрининговый и медленный, позволяющий улучшить разделение.

Колонку EVDX-5ms (слабополярная, 5% фенилметилсилоксан) длиной 25 м, внутренний диаметр 200 мкм, толщина фазы 32 мкм применяли в условиях:

- «быстрый» режим (индексы Ковача $I_{I,F}$): начальная температура 50°C (0.5 мин), подъем со скоростью 99°C/мин до 100°C, выдержка 1 мин, подъем со скоростью 35°C/мин до 300°C, выдержка 10 мин. Первые 3 стадии одинаковы для всех режимов на обеих колонках и поэтому далее не указаны;

- «медленный» режим ($I_{I,S}$): подъем со скоростью 15°C/мин до 280°C, выдержка 20 мин.

Колонку DB-17ms (среднеполярная, 50% фенилметилсилоксан) длиной 15 м, внутренний диаметр 250 мкм, толщина фазы 25 мкм применяли в условиях:

- «быстрый режим» ($I_{2,F}$): подъем со скоростью 20°C/мин до 300°C, выдержка 20 мин;

- «медленный режим» ($I_{2,S}$): подъем со скоростью 9°C/мин до 280°C, выдержка 30 мин.

Скорость газа-носителя (гелия) постоянная, 0.8 и 1 мл/мин соответственно для первой и второй колонок.

Для обработки масс-хроматограмм использовали систему AMDIS (NIST).

ВЭЖХ. Жидкостнохроматографические измерения выполняли на модульной системе 1200 (Agilent Technologies) с бинарным насосом G1312A и диодно-матричным детектором G1315B. Колонку Eclipse XDB-C18 (4.6*150 мм) с форколонкой (4.6*12.5 мм), заполненную этим же сорбентом термостатировали (25°C), скорость потока элюента составляла 1 мл/мин. Детектирование при 205 нм, запись спектра 200-500 нм. Остальные условия указаны в тексте. Условный мертвый объем системы определяли нитратом натрия.

Для приготовления элюента использовали фосфатные буферы с концентрацией 10 мМ, подстроенные до требуемой *pH* ортофосфорной кислотой или гидроксидом натрия. Добавки органического модификатора (ацетонитрила) выполняли с помощью бинарного насоса хроматографа.

ИК. Спектры (область 4000-400 cm^{-1}) регистрировали на спектрометре FTS Scimitar 2000 (Digilab) в таблетках KBr. В случае работы с соединениями, очищенными методом ВЭЖХ, применяли следующую методику: выделенную фракцию разбавляли водой в 3 раза и экстрагировали в хлороформ. После полного упаривания растворителя в струе воздуха при температуре не выше 45°C сухой остаток растворяли в 100-200 мкл хлороформа и наносили на порошок KBr, после чего упаривали без нагревания при перемешивании и готовили таблетку.

Сопоставление компонентов, наблюдаемых в условиях ВЭЖХ и ГЖХ-МС, было проведено с помощью выделения водных ВЭЖХ-фракций и экстракции компонентов, содержащихся в них, в хлороформ или этилацетат после подщелачивания водных фаз аммиаком до *pH*~9 (при необходимости).

Синтез неристоксина. Способ синтеза 1,2-дитиоланов посредством гидролиза ди-(бензотиосульфонов) при участии межфазного катализатора описан в [6]. Поскольку мы не нуждались в высоких выходах целевого соединения, то использовали упрощенный способ синтеза. К примерно 700 мг банкола добавляли 3 мл ацетона, энергично взбалтывали до полного смачивания порошка и обрабатывали на ультразвуковой бане в течение 15 мин. Затем центрифугировали, полученный раствор отделяли от осадка, фильтровали и упаривали в токе воздуха при температуре не выше 45°C. Выход полученного бенсультапа (желто-бурое легко кристаллизующееся масло) составляет примерно 50% от массы банкола, что соответствует декларированному содержанию. К выделенной субстанции добавляли 2 мл метанола и 2 мл водного раствора аммиака (1:1). Смесь перемешивали и нагревали при 50°C до полного растворения субстанции, затем охлаждали и выдерживали 1 сутки при комнатной температуре. Далее упаривали при 50°C в токе воздуха примерно до половины исходного объема, добавляли 2 мл воды и разделяли экстракцией:

- подкисляли ортофосфорной кислотой до *pH*~2 и экстрагировали этилацетатом. При этом удаляется непрореагировавший бенсультап;

- подщелачивали водную фазу до *pH*~9 и также экстрагировали этилацетатом. После упаривания этилацетата получили около 50 мг желто-бурого масла, которое растворяли в небольшом количестве этилацетата и хранили в холодильнике.

Жидкостную экстракцию из образцов мочи проводили по следующей методике: подщелачивали водную фазу раствором аммиака до $pH \sim 10$ и дважды экстрагировали в хлороформ (соотношение фаз 1:1). Органические экстракты объединяли, сушили над безводным сульфатом натрия, упаривали в токе воздуха при температуре не выше $45^\circ C$ и растворяли сухой остаток в этаноле.

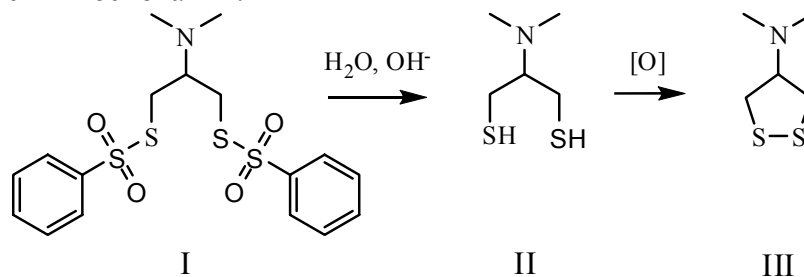
Ацетилирование проводили по стандартной методике в смеси уксусного ангидрида и пиридина (1:1), сухие продукты растворяли в этаноле.

Все использованные реактивы марки «хч» или «чда». Ацетонитрил «Panreac», «gradient grade».

Обсуждение результатов

Бенсультап.

Как указано выше, это соединение легко гидролизуется в водной среде в присутствии оснований:



(вторая стадия – окисление – проходит очень быстро уже в присутствии кислорода воздуха, [7]).

Более того, согласно нашим оценкам, гидролиз идет с заметной скоростью также и в кислых средах. Так, в водных растворах, содержащих 10 мМ фосфатного буфера и 50 об.% ацетонитрила степень конверсии (исчезновения) бенсультапа составляет 6, 11, 32 и 85% за 2 часа при комнатной температуре и pH 2.80, 5.80, 7.07 и 8.25 соответственно. Бенсультап – термолабильное соединение, и потому использование метода ГЖХ для его определения затруднительно. Возможно, нормально-фазовые варианты жидкостной хроматографии бенсультапа следовало бы признать наиболее разумными. Но в условиях доминирования обращенно-фазового варианта необходимость перестройки хроматографической системы (а при использовании насосов Agilent 1200 еще и смена манжет) делает их весьма накладными. При работе с кислыми элюентами гидролиз бенсультапа никак не отражается на виде хроматограммы; следует лишь заботиться о достаточно оперативной обработке растворов, содержащих бенсультап. Метод ВЭЖХ вполне пригоден для идентификации бенсультапа при необходимости подтверждения предварительных результатов, полученных методом ТСХ.

На рис. 1 приведена хроматограмма продажного образца бенсультапа и его УФ-спектр в условиях элюирования. Состав подвижной фазы – линейный градиент от 50 до 90 об.% ацетонитрила в фосфатном буфере pH 3. Калибровочный график линеен, по крайней мере, в диапазоне 0.3-300 мкг/мл. Порог обнаружения около 0.05 мкг/мл.

ТФЭ. Вследствие нестабильности бенсультапа в основной среде, использование ионообменного механизма для его выделения не представляется разумным. Возможно применение нормально-фазовых режимов, хотя такой вариант может оказаться непрактичным как по причине меньшей распространенности

подобных способов очистки, так и вследствие меньшей нагрузочной способности нормально-фазовых патронов. Поэтому мы использовали гидрофобный вариант на патроне AccuBOND II ODS-C18 (200мг * 3 мл), Agilent Technologies. По причинам, описанным выше, мы ограничились выделением бенсультапа из простых модельных растворов. Тем не менее (вследствие характеристик удерживания бенсультапа на октадецильной фазе и режима использования сорбента), описанный способ вполне пригоден для реальных биообъектов. Образец (5 мл раствора бенсультапа в 30 об.% ацетонитрила в воде с добавкой 3 мл фосфатного буфера 50 мМ *pH* 5) загружали на патрон, предварительно промытый 6 мл ацетонитрила и 6 мл фосфатного буфера того же состава. Затем патрон промывали 3 мл раствора 30 об.% ацетонитрила в воде, сушили в течение 5 мин и элюировали этилацетатом. Этилацетат упаривали в токе воздуха при температуре не выше 45°C, растворяли остаток в стартовом элюенте и определяли содержание методом ВЭЖХ. Выход составил 96%. Данная методика достаточно надежна: мы не нашли бенсультап ни в одной порции раствора, прошедшего через патрон (кроме элюата), в том числе и при увеличении числа промывок до 4.

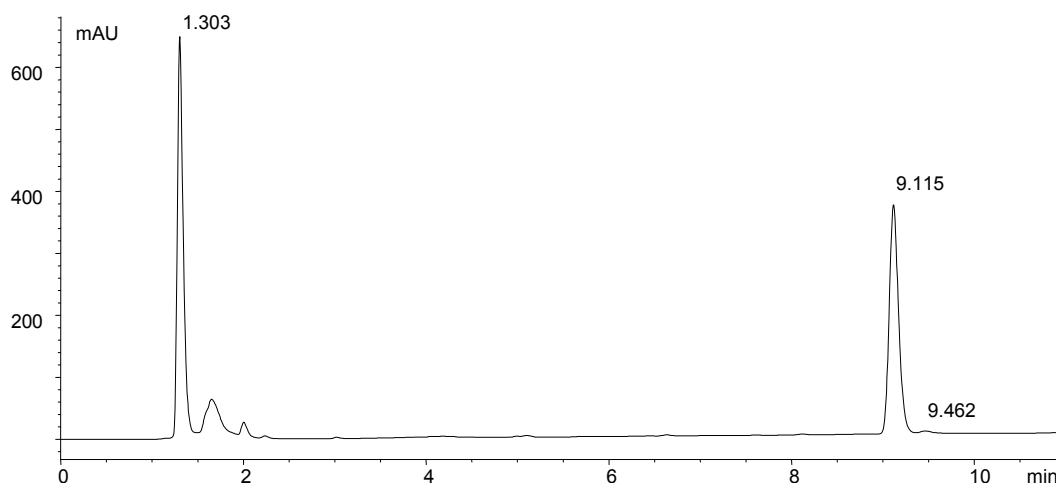


Рис. 1 ВЭЖХ-хроматограмма образца бенсультапа (9.12 мин) и его УФ-спектр в элюенте

Нереистоксин.

Предварительные исследования показали, что нереистоксин нестабилен: в его растворах при стоянии образуются, по крайней мере, 3 компонента. Эти же соединения присутствуют в синтетической смеси (рис. 2, 3). Поскольку очевидно, что данные компоненты могут присутствовать и в биообразцах, мы предприняли ряд попыток по их идентификации.

Учитывая легкую окисляемость дисульфидов [8], возможно предположить следующую схему (ниже приведена структура тиоциклама VI):

В ее пользу говорит также образование заметных количеств IV в кислых растворах III в присутствии небольших количеств перекиси водорода. Кроме того, можно отметить следующее. Нереистоксин (III) не имеет хиральных атомов. Но при переходе III→IV образуется сразу 2 оптических центра; таким образом, следует ожидать образования смеси диастереомеров. Как на ВЭЖХ-, так и на ГЖХ-хроматограммах заметны 2 компонента, обладающие очень близкими УФ- и масс-спектральными характеристиками (см. ниже). Хроматографическое поведение этих компонентов подобно также.

Далее мы приводим спектральные и хроматографические характеристики III-V.

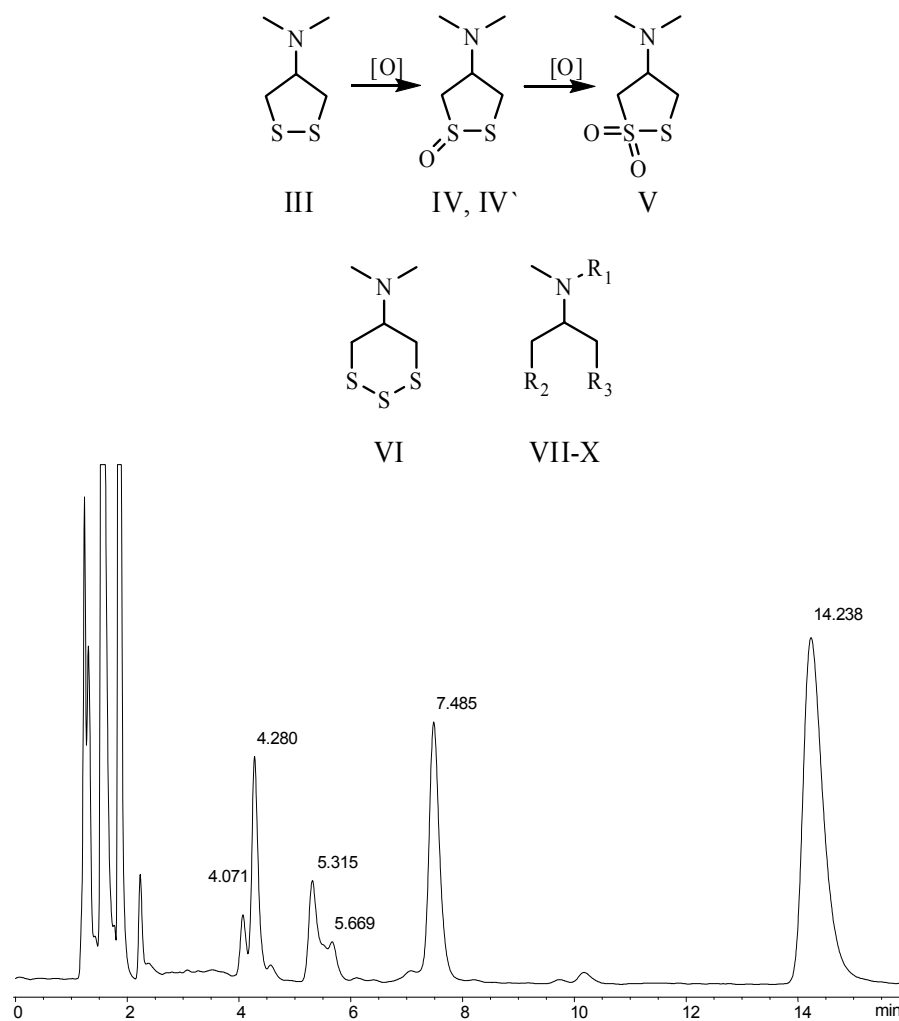


Рис.2. ВЭЖХ-хроматограмма компонентов гидролизной смеси. Состав подвижной фазы: 8 об.% ацетонитрила в фосфатном буфере (10 мМ, рН 3 с добавкой 5 мМ гексансульфоната натрия). (Времена удерживания компонентов II – 14.25, IV' - 4.07, IV – 4.28, V - 7.49 мин)

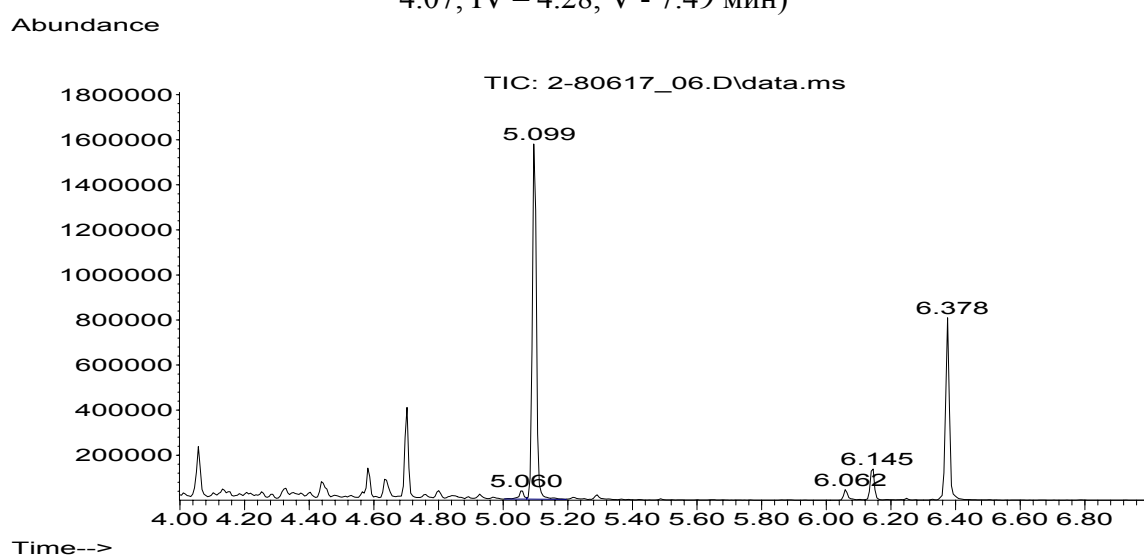


Рис. 3. ГЖХ-МС-хроматограмма компонентов гидролизной смеси. Колонка EVDX-5ms, «быстрый» режим. (Времена удерживания компонентов III – 5.10, IV' - 6.06, IV – 6.15, V - 6.39 мин)

Масс-спектры. Вероятные молекулярные ионы соединений IV, IV' (m/z 165) и V (m/z 181) малоинтенсивны (1-3%), поэтому определение масс этих соединений следует считать предполагаемым. Тем не менее, кластеры изотопных ионов этих соединений (рис.4) ясно указывают на наличие серы (относительные интенсивности пиков ионов искажены вследствие их измерения вблизи пороговых значений). Также можно отметить наличие ионов $[M-H]^+$, что свидетельствует о вероятной енолизации молекулярных ионов, характерной для сульфоксидов [9] и сульфонов (например, 1,2-дитиолана-1,1-диоксида, библиотека NIST05). Спектры всех рассматриваемых соединений характеризуются интенсивными сигналами ионов $[C_4H_9N]^{++}$ (m/z 71).

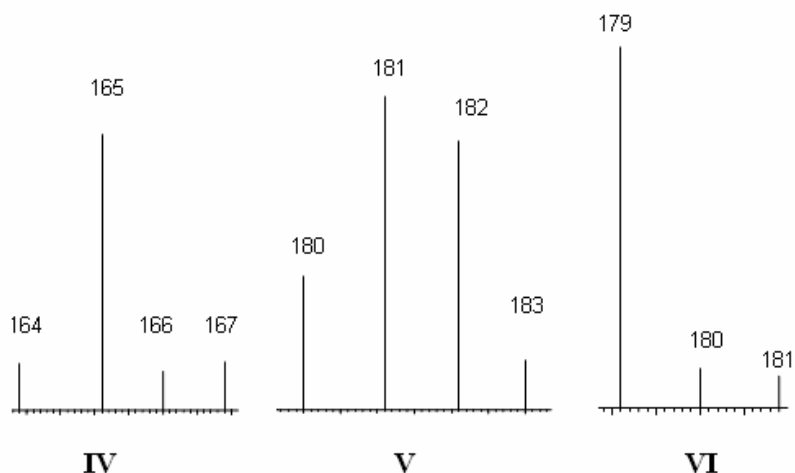


Рис. 4. Кластеры предполагаемых молекулярных ионов соединений IV, V, VII

Спектры соединений III, IV, IV' VI имеют интенсивные пики $[M-CH_2S]^+$, (у V этот пик также существует, хотя малоинтенсивен) что говорит о подобии их структур; соединения IV, IV' характеризуются наличием $[M-OH]^+$ (m/z 148) – одним из характеристичных ионов S-оксидов тиоцикланов [9, 10].

ИК, УФ-спектры. Фрагменты спектров соединений IV V приведены на Рис.5. В спектре соединения IV можно отметить наличие интенсивной полосы при 1071 см^{-1} , а в спектре V – двух полос 1310 и 1132 см^{-1} (рис.5). Эти наблюдения не противоречат указанием на наличие полосы 1132 см^{-1} у сульфоксидов вида $RS(O)R$ и двух полос 1324 и 1151 см^{-1} у сульфонов $RS(O)_2R$ [8], где отмечается, что все полосы (предположительно обусловленные вибрационными колебаниями связи S-O) интенсивны. Для соединения V также можно отметить подобие положения полос с данными работы [10].

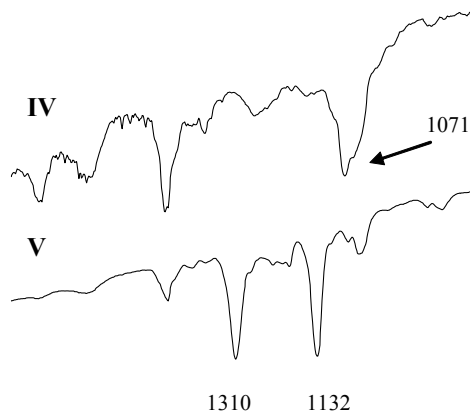


Рис. 5. Фрагменты ИК-спектров соединений IV, V

УФ-спектры компонентов III-V (в элюенте 10 об.% ацетонитрила в фосфатном буфере 10 мМ, pH 3 с добавкой 5 мМ гексансульфоната) приведены на рис.6. Величины λ_{MAX} для нереистоксина – 207 и 321 нм (вторая полоса соответствует поглощению дисульфидной группе в пятичленном цикле [7]); для компонента III – 241 нм и плечо ~204 нм. Компонент V характеризуется только концевым поглощением и очень слабой полосой 254 нм.

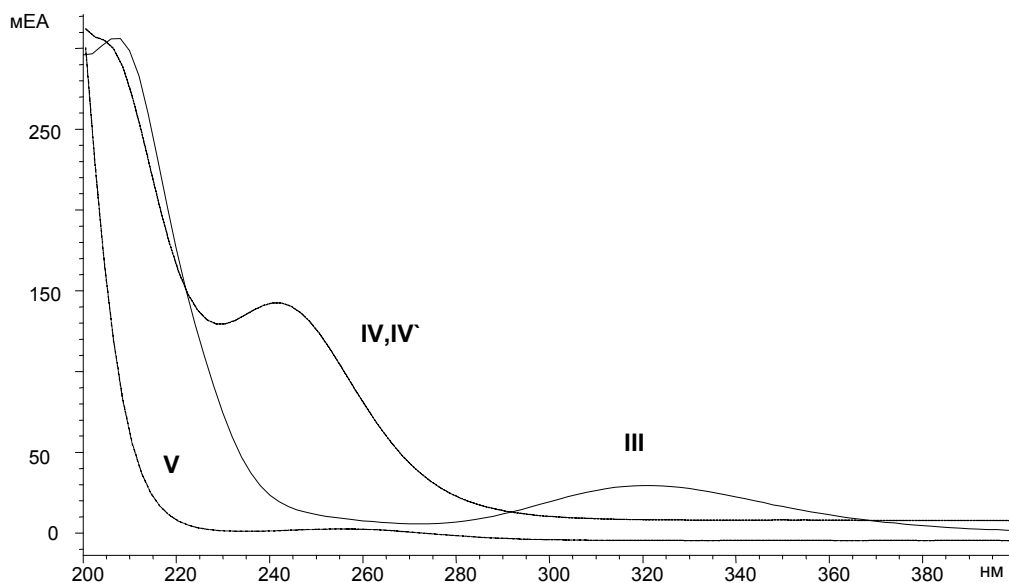


Рис. 6. УФ-спектры соединений III - V

ГЖХ-индексы удерживания. В табл. 1 приведены индексы удерживания соединений, найденных в гидролизной смеси для двух фаз – слабополярной (EVDX-5ms) и среднеполярной (DB-17). В первую очередь можно отметить порядок удерживания для слабополярной фазы: $V > IV > IV' > III$, что может говорить о снижении температуры кипения в данном ряду. Разницы между индексами удерживания для среднеполярной и слабополярной фаз (последний столбец таблицы) минимальны для нереистоксина и тиоциклама – соединений, не имеющих в своей структуре кислородных атомов.

Таблица 1. Индексы удерживания рассматриваемых соединений (в порядке увеличения удерживания на слабополярной фазе)

Соединение	M	EVDX-5ms			DB-17ms		$I_{2,S} - I_{1,S}$
		$I_{1,F}$	$I_{1,S}$	$I_{1,F} - I_{1,S}$	$I_{2,F}$	$I_{2,S}$	
III (нереистоксин)	149	1309	1297	13	1527	1516	219
IV'	165	1551	1529	21	1892	1867	338
IV	165	1580	1558	22	1927	1903	345
V	181	1637	1615	22	2028	2003	388
VI (тиоциклам)	181	1554	1532	23	1803	1780	248
VII	179	1396	1387	9	1602	1594	207
VIII	195	1696	1681	16	2064	2042	361
VIII	195	1696	1681	16	2067	2046	366
IX	207	1595	1587	8	1850	1840	253
X	223	1713	1702	11	1999	1986	284

Величины pK_a . Присутствие в молекуле нереистоксина третичного азота с алкильными заместителями могло бы привести к предположению о его $pK_a \sim 10$. Тем не менее, это не так. Измерение pK_a хроматографическим методом (в элюентах 30 об.% ацетонитрила в фосфатном буфере, рис. 7) привело к величине 6.20 (Таблица 2, доверительный интервал указан для доверительной вероятности 95%), что более соответствует наличию арильного заместителя и делокализации неподеленной пары электронов атома азота. Причиной такой делокализации разумеется, является близость сопряженного дисульфидного фрагмента. Соединения IV (IV') и V депротонируются еще легче. Величины pK_a располагаются в ряду III > IV > V, что может свидетельствовать о последовательном изменении структур.

Следует также отметить, что при переходе в молекулярные формы, УФ-спектры компонентов III-V несколько изменяются: в частности, для V исчезает слабая полоса 254 нм; для компонента IV полоса 241 нм почти не выражена (плечо).

Таблица 2. Наклоны линейно-логарифмической зависимости относительного удерживания. В скобках указаны значения квадрата коэффициента корреляции (R^2)

Соединение	Гексансульфонат	Ацетонитрил	pK_a
III (нереистоксин)	-	-	6.20±0.09
IV	1.213 (0.994)	1.009 (0.999)	5.1±0.3
V	0.997 (0.999)	0.790 (0.999)	4.03±0.07

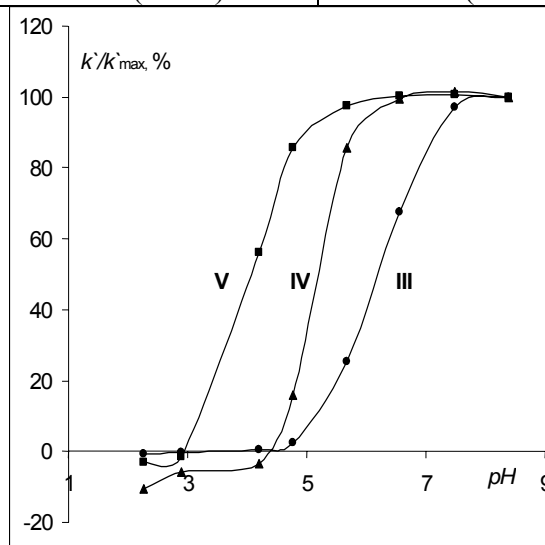


Рис. 7. Изменение относительных величин k' , %, при варьировании pH элюента

ВЭЖХ, добавки ион-модифицирующего реагента (гексансульфонат натрия) в кислой среде. Как предыдущее, так и данное наблюдение свидетельствует о том, что в кислых элюентах ($pH \leq 3$) все 3 соединения находятся в катионной форме. Варьирование содержания гексансульфоната в элюенте приводит к выводу об однозарядности катионов IV и V. Поскольку катион нереистоксина однозаряден, то основанием для такого вывода служит близость к 1 коэффициентов b_i (наклонов линейной зависимости) уравнения 1, выражающего в логарифмической форме удерживание IV, V относительно III (табл. 2, состав элюента 8 об.% ацетонитрила в фосфатном буфере $pH 3$).

$$\lg k'_i = a_i + b_i * \lg k'_{III} \quad (1)$$

ВЭЖХ, добавки ацетонитрила. Эту характеристику исследовали в слабоосновных элюентах (pH 8.2), в которых все 3 соединения находятся в молекулярной форме. Также для определения относительного удерживания использовали линейно-логарифмическую зависимость (1). Рассчитанные коэффициенты b_i приведены в табл. 2. В то время, как изменение удерживания IV полностью подобно изменению удерживания нереистоксина, соединение V демонстрирует очевидное отличие (наклон b_i значительно ниже), что может говорить о меньшем числе молекул ацетонитрила, необходимых для замещения молекулы V в неподвижной фазе [11].

ТФЭ. Соединения III-V являются катионами при $pH \leq 3$ и неплохо растворимы в воде. Однако, к сожалению, для их выделения неприменимы ионообменные методы. Попытки сорбции их на патронах AccuBOND II EVIDEX (200 мг * 3 мл, заполненных смешанным гидрофобно-катионообменным сорбентом), производства Agilent Technologies приводили к относительно высоким выходам только при низкой ионной силе загружаемого раствора. При переходе к реальным образцам (моча, экстракты биологических тканей) выход аналитов резко снижался (~15%), что скорее всего, обусловлено малыми константами обмена.

Конечно же, эти соединения могут быть экстрагированы с применением гидрофобного механизма, но подобный подход неизбежно расширит круг соэлюируемых соединений, а следовательно, значительно снизит чистоту экстрактов.

В таком случае можно воспользоваться различием гидрофобного удерживания ионных и молекулярных форм III-V (рис. 7). Действительно, такой подход не является стандартным способом использования обращенно-фазовых патронов. Но различие в удерживании форм (30-50 раз) делает его вполне применимым.

5 мл водного раствора образца доводили до pH 9 добавками водного раствора аммиака, приливали 3 мл 100 мМ водного раствора K_2HPO_4 ($pH \sim 8.3$) и загружали на патрон, предварительно промытый 6 мл ацетонитрила и 6 мл раствора гидрофосфата калия. Затем патрон промывали 3 мл раствора того же буфера и элюировали 3 мл фосфатного буфера 100 мМ pH 2. Полученный элюат подщелачивали водным раствором аммиака до pH 9 и экстрагировали в этилацетат или хлороформ (коэффициенты распределения для нереистоксина больше 9). Органический растворитель упаривали в токе воздуха при температуре не выше $45^\circ C$, растворяли остаток в подходящем растворителе и определяли содержание методом ВЭЖХ или ГХ-МС.

Выход соединений III-V составил 88, 74, 86% соответственно на модельных (водных) растворах; приведенные значения усреднены по измерениям выходов на двух патронах.

Надежность сорбции соединений III-V исследовали методом ВЭЖХ с помощью последовательных промывок патрона раствором гидрофосфата калия после загрузки образца. В основном, элюируется соединение V; остальные соединения в промывочных растворах не обнаружены.

Потери нереистоксина обусловлены в основном, затяжкой его концентрационного профиля при элюировании. Эта затяжка вызвана катионной активностью сорбента и при необходимости может быть снижена увеличением количества элюента (например, при двукратном элюировании выход увеличивается до 92-95%), либо добавками азотистого основания (триэтиламина). Тем не менее, важного практического значения подобные осложнения не имеют.

Выход нереистоксина при извлечении его из мочи составил 93% (расхождение между двумя параллельными определениями 0.6%).

Водные извлечения, полученные из биологических тканей с добавками банкола очищали по такой же методике, но количественных измерений не проводили. Основным компонентом выделенной смеси является нереистоксин.

Для увеличения эффективной концентрации нереистоксина в экстрактах биообразцов схема анализа может быть дополнена стадией основного гидролиза остаточного бенсультапа. Но, учитывая быструю метаболизацию нереистоксина и его прекурсоров, а также его нестабильность мы полагаем эту стадию необязательной по крайней мере, в большинстве практических случаев.

Порог обнаружения нереистоксина при использовании колонки EVDX-5ms и «быстрого» температурного режима примерно равен 0.1 мкг/мл (регистрация общего ионного тока).

Метаболиты нереистоксина.

Согласно [12], основными путями метаболизации **III** у млекопитающих являются S-метилирование, окисление и N-дезметилирование, проходящие через стадию образования дигидронереистоксина **II**. В моче человека, случайно принявшего банкол внутрь нами обнаружено 3 соединения (после ацетилирования образца – еще 2 соединения), идентифицированные как метаболиты нереистоксина.

Кластер предполагаемого молекулярного иона соединения **VII** ($R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = R_3 = \text{SCH}_3$,) указывает на наличие серы (Рис. 4); изменение индексов удерживания (табл. 1) говорит о малой полярности. Соединения **VIII**, **VIII'** почти не разделяются ни в одних из использованных условиях ГЖХ, (кроме «медленного режима» на колонке DB-17ms) и обладают подобными масс-спектрами. Значительное изменение их индексов удерживания при переходе от слабополярной к среднеполярной фазе, а также появление интенсивной линии m/z 134 (по сравнению с m/z 118 у **VII**), позволяет сделать вывод о наличии атома кислорода в их структурах ($R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{S(O)CH}_3$, $R_3 = \text{SCH}_3$,). Подобно **IV**, **IV'**, эти соединения являются диастереомерами.

Соединения **IX**, **X**, появляющиеся после ацетилирования образца мочи, идентифицированы как ацетаты продуктов N-дезметилирования соединений **VII** и **VIII** соответственно (**IX**: $R_1 = \text{C(O)CH}_3$, $R_2 = R_3 = \text{SCH}_3$; **X**: $R_1 = \text{C(O)CH}_3$, $R_2 = \text{S(O)CH}_3$, $R_3 = \text{SCH}_3$). Такое заключение подтверждено подобием разницы индексов удерживания ($I_{2,S} - I_{1,S}$) при смене фазы. Для соединения **X** эта разница несколько выше (Табл. 1). Оба соединения характеризуются наличием интенсивной линии m/z 176.

ТФЭ. К сожалению, перечисленные метаболиты плохо удерживаются на обращенно-фазовых патронах AccuBOND II ODS-C18, что может быть связано с высокими величинами их pK_a .

Патроны AccuBOND II EVIDEX могут быть использованы для выделения диметилдигидронереистоксина **VII** из экстрактов биообразцов что может оказаться вполне достаточным для идентификации отравления банколом, поскольку (по крайней мере, в наших измерениях) это соединение является одним из основных наблюдаемых метаболитов. Тем не менее, нам не удалось добиться высоких значений выхода. Причины этого затруднения, по-видимому, аналогичны причинам низкого выхода, получаемого при выделении нереистоксина с использованием этих же патронов. Количественные измерения проводили на образцах мочи с добавками смеси метаболитов по следующей методике.

5 мл мочи подкисляли до $pH \sim 2$ ортофосфорной кислотой и добавляли 3 мл водного раствора ортофосфорной кислоты (pH 2). Полученную смесь фильтровали и наносили на патрон, предварительно промытый последовательно 6 мл ацетонитрила

и 6 мл водного раствора ортофосфорной кислоты (pH 2). Затем патрон промывали 3 мл этого же раствора кислоты, 3 мл ацетонитрила и сушили в течение 1 мин. Элюировали 3 мл смеси 78:20:2 (дихлорметан:изопропанол:водный раствор аммиака, конц.). Элюат упаривали при температуре не выше $45^{\circ}C$ в токе воздуха, полученный сухой остаток растворяли в необходимом количестве этанола и анализировали методом ГЖХ. Выход соединения VII составил 52% (при усреднении результатов, полученных при использовании двух патронов). Выход соединений VIII, VIII' очень низок (менее 5 %); выход дезметилированных продуктов не измеряли количественно, тем не менее, он также невысок (около 10-20 %).

Данная методика является общей для определения основных соединений в экстрактах биообразцов. Из-за необходимости применения широкого диапазона pH , получаемые элюаты не могут быть очень чистыми, однако содержание в них посторонних примесей значительно ниже, чем в растворах, получаемых при обычной процедуре экстракции.

Масс-спектры соединений III-X.

III (нереистоксин): 45 (67), 46 (30), 47 (14), 48 (2), 49 (1), 51 (1), 52 (3), 53 (2), 54 (18), 55 (28), 56 (225), 57 (22), 58 (112), 59 (39), 60 (5), 61 (22), 62 (2), 63 (1), 64 (16), 65 (2), 66 (3), 67 (1), 68 (16), 69 (13), 70 (1000), 71 (705), 72 (40), 73 (10), 74 (3), 76 (3), 77 (2), 78 (10), 79 (3), 80 (1), 82 (2), 83 (3), 84 (107), 85 (10), 86 (14), 87 (15), 88 (87), 89 (5), 90 (4), 100 (16), 101 (3), 102 (24), 103 (245), 104 (24), 105 (32), 106 (2), 107 (2), 108 (1), 114 (3), 115 (1), 117 (1), 149 (627), 150 (48), 151 (57), 152 (4), 153 (2).

IV: 45 (90), 46 (41), 47 (18), 48 (17), 52 (4), 54 (26), 55 (39), 56 (260), 57 (27), 58 (159), 59 (33), 60 (4), 61 (15), 62 (4), 64 (9), 68 (19), 69 (15), 70 (491), 71 (1000), 72 (56), 73 (18), 74 (4), 76 (11), 77 (3), 78 (3), 80 (7), 82 (4), 83 (3), 84 (44), 85 (61), 86 (18), 87 (20), 88 (43), 89 (6), 100 (21), 101 (5), 102 (118), 103 (79), 104 (14), 105 (30), 114 (4), 115 (3), 119 (788), 120 (44), 121 (40), 147 (3), 148 (16), 150 (4), 151 (4), 165 (3).

IV: 45 (73), 46 (37), 47 (16), 48 (16), 49 (2), 51 (1), 52 (4), 53 (2), 54 (24), 55 (38), 56 (261), 57 (21), 58 (153), 59 (27), 60 (5), 61 (10), 62 (3), 63 (2), 64 (6), 66 (2), 67 (2), 68 (18), 69 (16), 70 (395), 71 (1000), 72 (56), 73 (15), 74 (3), 75 (3), 76 (8), 77 (2), 78 (2), 80 (7), 81 (2), 82 (5), 83 (5), 84 (67), 85 (272), 86 (25), 87 (10), 88 (31), 89 (2), 90 (2), 92 (1), 100 (19), 101 (7), 102 (36), 103 (41), 104 (6), 105 (7), 114 (6), 115 (3), 116 (10), 117 (9), 119 (653), 120 (37), 121 (32), 147 (2), 148 (26), 149 (22), 150 (4), 151 (2), 165 (2).

V: 45 (44), 46 (21), 47 (11), 48 (10), 49 (1), 50 (1), 51 (1), 52 (2), 53 (1), 54 (16), 55 (25), 56 (311), 57 (16), 58 (96), 59 (10), 60 (1), 61 (2), 64 (12), 65 (2), 66 (2), 67 (1), 68 (8), 69 (5), 70 (165), 71 (1000), 72 (54), 73 (16), 74 (1), 75 (1), 76 (2), 78 (1), 80 (1), 82 (3), 83 (1), 84 (7), 85 (2), 86 (3), 87 (2), 88 (8), 89 (1), 100 (6), 101 (3), 103 (13), 105 (1), 114 (1), 117 (3), 119 (1), 135 (2), 137 (1), 181 (1).

VI (тиоциклам): 45 (45), 46 (21), 47 (13), 52 (3), 53 (2), 54 (10), 55 (17), 56 (171), 57 (9), 58 (79), 59 (15), 61 (5), 64 (29), 65 (3), 66 (4), 68 (8), 69 (7), 70 (133), 71 (1000), 72 (57), 73 (30), 74 (4), 76 (10), 84 (8), 86 (6), 87 (4), 88 (7), 91 (2), 96 (3), 100 (9), 101 (5), 104 (3), 114 (2), 116 (2), 135 (731), 136 (50), 137 (72), 138 (5), 139 (2), 181 (23), 182 (2), 183 (3).

VII: 45 (23), 46 (9), 47 (10), 48 (3), 49 (1), 54 (4), 56 (48), 58 (28), 59 (7), 61 (64), 62 (2), 63 (3), 70 (79), 71 (417), 72 (26), 73 (13), 74 (1), 75 (8), 76 (2), 87 (12), 88 (5), 89 (1), 90 (1), 100 (2), 101 (2), 102 (12), 103 (38), 104 (3), 105 (2), 116 (1), 118 (1000), 119 (67), 120 (46), 121 (3), 162 (2), 179 (3).

VIII: 45 (29), 46 (10), 47 (12), 48 (4), 49 (2), 52 (1), 53 (3), 54 (7), 55 (16), 56 (110), 58 (32), 59 (7), 61 (101), 62 (4), 63 (13), 64 (4), 65 (1), 66 (1), 68 (7), 69 (2), 70 (98), 71 (1000), 72 (56), 73 (19), 74 (2), 75 (3), 76 (2), 82 (2), 83 (2), 84 (33), 85 (107), 86

(11), 87 (29), 88 (10), 89 (3), 90 (1), 92 (1), 100 (8), 101 (4), 102 (12), 103 (8), 104 (4), 105 (2), 114 (5), 115 (2), 117 (6), 118 (92), 119 (8), 120 (5), 130 (4), 131 (55), 132 (6), 134 (599), 135 (45), 136 (29), 137 (2), 151 (1), 178 (2).

IX: 45 (19), 46 (10), 47 (11), 48 (4), 49 (3), 58 (38), 59 (8), 60 (3), 61 (33), 62 (1), 71 (251), 72 (23), 74 (3), 75 (7), 86 (77), 87 (73), 88 (6), 89 (6), 90 (3), 100 (32), 101 (47), 102 (26), 103 (59), 104 (6), 114 (17), 115 (11), 116 (123), 117 (52), 118 (1000), 119 (66), 120 (45), 129 (3), 130 (24), 134 (6), 142 (25), 162 (5), 176 (133), 177 (25), 178 (22), 220 (2), 237 (2).

X: 46 (26), 47 (29), 48 (6), 54 (14), 56 (161), 58 (167), 59 (22), 61 (99), 68 (14), 69 (14), 70 (360), 71 (662), 72 (56), 73 (78), 76 (16), 84 (53), 100 (48), 101 (314), 102 (43), 103 (64), 114 (6), 116 (773), 117 (66), 118 (1000), 119 (73), 120 (48), 122 (5), 132 (8), 176 (803), 177 (78), 178 (41), 220 (4).

Список литературы

1. Draber W., Fujita T. Rational Approaches to Structure, Activity, and Ecotoxicology of Agrochemicals. «CRC Press» 1992. 608 p.

2. Summary of Toxicity Studies on Bensultap. (Development Department, Plant Protection Research, Agro Division, Takeda Chemical Industries, Ltd.) // J. Pesticide Sci. 1989. V. 14. № 4. P. 523-529.

3. Nishi K., Konishi K., Padan T.N. In: «Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators». Ed. by Zweig G. N.Y., «Academic Press». 1973. V. 7. P. 371-384.

4. Namera A., Watanabe T., Yashiki M., Kojima T., Urabe T. Simple and Sensitive Analysis of Nereistoxin and Its Metabolites in Human Serum Using Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry // J. Chromatogr. Sci. 1999. V. 37. № 3. P. 77-82.

5. Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде: Справочник. – Т.1 Сост. Клисенко М.А., Калинина А.А., Новикова К.Ф. и др. М., «Колос». 1992. 567 с.

6. Mitsudera H., Kamicado T., Uneme H., Kono Y. Synthesis and Biological Activity of 4-Alkylthio-1,2-dithiolanes and Related Compounds // Agric. Biol. Chem. 1990. V. 54. №7. P. 1719-1722.

7. Nagivara H., Numata M., Konishi K., Oka Y. Synthesis of Nereistoxin and Related Compounds // Chem. Pharm. Bull. 1965. V. 13. №3. P. 253-260.

8. Оаз С. Химия органических соединений серы. М., «Химия». 1975. 512 с.

9. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. М., «БИНОМ. Лаборатория знаний». 2003. 493 с.

10. Вульфсон Н.С., Заикин В.Г., Микая А.И. Масс-спектрометрия органических соединений. М., «Химия». 1986. 312 с.

11. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига, «Зинатне». 1988. 390с.

12. Thiocarbamate pesticides. // International Programme on Chemical Safety (IPCS). World Health Organization. Geneva, 1988