

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ОТРАВЛЕНИЯ ТРОПИКАМИДОМ, ВВЕДЕННЫМ В ЖЕЛУДОК ТЕПЛОКРОВНЫХ, НА ОСНОВЕ ОБНАРУЖЕНИЯ В ОРГАНАХ И КРОВИ ИСХОДНОГО ТОКСИЧЕСКОГО АГЕНТА И БЛИЗКИХ ПО СТРУКТУРЕ СОЕДИНЕНИЙ

© Шорманов В.К.¹, Правдюк М.Ф.²

¹ Кафедра фармацевтической, токсикологической и аналитической химии
Курского государственного медицинского университета, Курск;

² Республиканский наркологический диспансер
Минздрава Республики Северная Осетия-Алания, Владикавказ
E-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru

Изучена возможность доказательства отравления тропикамидом при его пероральном введении теплокровным животным на основе обнаружения в отравленных организмах как самого исходного токсического агента, так и близких к нему по структуре соединений (продуктов трансформации). Через различные промежутки времени после внутривенного введения полутонной ЛД₅₀ тропикамида в организм теплокровных (крысы) проводился поиск в различных органах и крови отравленных организмов исходного отравляющего агента и возможных продуктов его трансформации. Установлено присутствие тропикамида во всех исследованных органах и крови отравленных животных. В печени, ткани желудка, его содержимом и в ткани тонкого кишечника обнаружены и идентифицированы близкие по структуре к тропикамиду N-этил-N-(пиридин-4-ил-метил)-фенилацетамид, N-этил-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропенамид и N-этил-3-ацетокси-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропанамида. Обоснована возможность доказательства отравления тропикамидом на основе обнаружения в отравленных организмах исходного отравляющего агента и трех близких по структуре продуктов его трансформации.

Ключевые слова: тропикамид, продукты трансформации, обнаружение в организме и идентификация, доказательство отравлений.

PROOF OF POISONING WITH TROPICAMIDE INTRODUCED INTO STOMACH OF WARM-BLOODED ANIMALS, BASED ON THE DETECTION OF THE ORIGINAL TOXIC AGENTS AND THE COMPOUNDS WITH THE SIMILAR STRUCTURE IN ORGANS AND BLOOD

Shormanov V.K.¹, Pravdyuk M.F.²

¹ Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry of Kursk State Medical University, Kursk;
² Republican Dispensary of Narcology of Ministry of Health of Republic of North Ossetia-Alania, Vladikavkaz

The possibility of poisoning with tropicamide after its oral introduction to warm-blooded animals has been studied in terms of the detection of the toxic agent and compounds with the similar structure (products of transformation) in poisoned organisms. After introducing LD₅₀ of tropicamide intragastrically to warm-blooded animals (rats) in various intervals we were searching for the toxic agent and possible products of its transformation in various organs and blood of poisoned animals. The presence of tropicamide in all the examined organs and blood of poisoned animals was established. There we determined and identified compounds with the similar structure, such as N-ethyl-N-(pyridin-4-yl-methyl)-phenylacetamide, N-ethyl-2-phenyl-N-(pyridin-4-yl-methyl)-propenamide and N-ethyl-3-acetoxy-2-phenyl-N-(pyridin-4-yl-methyl)-propanamide in liver, stomach tissue and its contents, and in small intestine tissue. The possibility of poisoning by tropicamide as evidenced by detection in poisoned organisms of the toxic agent and three products of transformation with the similar structures was grounded.

Keywords: tropicamide, products of transformation, the detection and identification in the body, the proof of poisoning.

Тропикамид (N-Этил-3-гидрокси-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропанамида) (синонимы: мидриацил, бистропонамид) – биологически активное вещество, обладающее м-холиноблолирующим действием и применяющееся в медицинской практике как мидриатическое средство при исследовании глазного дна, а также при диагностике некоторых форм деменции [2, 8, 9].

Широко известно немедицинское применение тропикамида. В частности, данное соединение наркозависимые люди вводят в организм перорально или внутривенно для достижения одурманивающего эффекта или для усиления состояния

эйфории, обусловленной последующим приемом опиатов и опиоидов [1, 3, 6].

Тропикамид (молярная масса – 284,353 г/моль) представляет собой белые кристаллы без выраженного запаха, плавящиеся при температуре 97°C, способные хорошо растворяться в ацетоне и хлороформе, растворимые (5,7 г в 100 г растворителя) в этаноле и ДМСО и практически нерастворимые (<1 г в 100 г растворителя) в воде.

Рассматриваемое соединение достаточно токсично для теплокровных организмов. LD₅₀ для крыс составляет 865 мг/кг при пероральном,

1210 мг/кг – при интраперитонеальном и 1210 мг/кг при подкожном введении.

Описаны многочисленные случаи отравления людей тропикамидом различной степени тяжести как в случае его совместного применения с различными наркотиками, так и самостоятельно [3].

Вопросы определения тропикамида в органах и биожидкостях человека до настоящего времени разработаны недостаточно [4, 7].

Учитывая несомненное судебно-химическое значение тропикамида, совершенствование способов доказательства отравлений данным веществом, в особенности летальных, представляет собой важную задачу теории и практики химико-токсикологического анализа [1, 4].

Цель исследования: изучение возможности доказательства отравления тропикамидом при его пероральном введении теплокровным животным на основе обнаружения в отравленных организмах как самого исходного токсического агента, так и близких к нему по структуре соединений (продуктов трансформации).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования - N-этил-3-гидрокси-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)пропанамид (тропикамид) (PCO с содержанием основного вещества $\geq 99,0\%$ (определено методом неводного титрования)).

Определяли возможность присутствия в организме всеядных теплокровных организмов (на примере лабораторных крыс) исходного отравляющего агента и близких к нему по структуре веществ (возможных продуктов трансформации) через различные промежутки времени после внутрижелудочного введения тропикамида в организм (20 мин, 2,5 часа, 6 часов). При этом в каждом случае 25 крысам-самцам породы Wistar 5-месячного возраста (5 опытных групп по 5 особей в каждой) с массой от 290 до 305 г вводили через зонд в желудок однократно N-этил-3-гидрокси-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)пропанамид (1300 мг на 1 кг массы животного – полуторная LD₅₀) в виде смеси водного раствора и водной суспензии. После декапитации животных через заданный промежуток времени их трупы вскрывали, одинаковые органы и биожидкости, взятые от животных внутри каждой из групп, объединяли и исследовали на наличие в них N-этил-3-гидрокси-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)пропанамида (тропикамида) и близких по структуре веществ (продуктов трансформации). Исследованию подвергали также органы и биожидкости животных контрольной группы (5 особей), которым вводили в желудок дистил-

лированную воду без анализируемого вещества [5].

Изолирование. Измельченную ткань органов (размеры частиц 0,2-0,5 см) или кровь настаивали при периодическом перемешивании дважды (по 45 минут) с порциями ацетона, масса каждой из которых в два раза превышала массу биоматериала, но была не меньшей, чем 4 мл по объему. Отдельные извлечения объединяли в выпарительной чашке, растворитель испаряли в токе воздуха при температуре 18-22°C до получения остатка.

Очистка извлечений. Остаток, полученный на завершающей стадии этапа изолирования, растворяли в 5 мл 6% раствора щавелевой кислоты, полученный щавелевокислый раствор подщелачивали 10% раствором гидроксида натрия до pH 9 и экстрагировали двукратно хлороформом порциями по 5 мл каждая. Экстракты объединяли, обезвоживали путем фильтрования через двухслойный бумажный фильтр, фильтрат упаривали в выпарительной чашке в токе воздуха при температуре 18-22°C до сухого остатка.

Обнаружение и идентификация веществ методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ МС). Сухой остаток, полученный на завершающей очистки извлечений, растворяли в 2 мл хлороформа. При необходимости (в случае присутствия больших количеств анализируемого вещества) раствор разбавляли хлороформом. 2 мкл хлороформного раствора вводили в газовый хроматограф «Маэстро» ГХ модели 7820 с квадрупольным масс-селективным детектором «Agilent Technologi» 5975. Введение пробы осуществляли без деления потока. Условия анализа: колонка – кварцевая капиллярная HP-5MS (30 м×0,25 мм×0,25 мкм) с неподвижной фазой (5%-фенил)метилполисилоксан; температура инжектора – 260°C, интерфейса детектора – 280°C; начальная температура термостата колонки – 90°C, затем температура колонки изменялась от 90°C до 280°C со скоростью 20°C/мин; температура квадруполь составляла 150°C, источника ионов 230°C; газ-носитель – гелий, подаваемый со скоростью 23,10 мл/мин с задержкой на растворитель в 3 минуты. Масс-селективный детектор работал в режиме электронного удара (70 эВ). Сигнал регистрировали по полному ионному току. Диапазон сканирования – 40-500 m/z. Тропикамид и близкие к нему по структуре соединения обнаруживали в виде пиков на хроматограммах с определенными значениями времени удерживания и идентифицировали их по особенностям масс-спектров, совпадающих с масс-спектрами стандартных веществ электронной библиотеки на 86% и более.

Таблица 1

Вещества, обнаруженные в организме отравленных животных (крыс) через различные промежутки времени после однократного внутривенного введения тропикамида в количестве 1300 мг на кг массы животного

Биологический объект (орган или биожидкость), подвергнутый исследованию	Промежуток времени с момента введения тропикамида до момента гибели животных (начала исследования)	Вещества, обнаруженные в биологическом объекте
Печень	20 минут	Тропикамид NЭN-(П-4-ил-М)-ФАА NЭ3АО2ФN-(П-4-ил-М)-ПА
	2,5 часа	Тропикамид NЭ2ФN-(П-4-ил-М)-ПА NЭN-(П-4-ил-М)-ФАА
	6 часов	Тропикамид
Ткань желудка	20 минут	Тропикамид NЭ2ФN-(П-4-ил-М)-ПА NЭN-(П-4-ил-М)-ФАА
	2,5 часа	Тропикамид NЭ2ФN-(П-4-ил-М)-ПА NЭN-(П-4-ил-М)-ФАА NЭ3АО2ФN-(П-4-ил-М)-ПА
	6 часов	Тропикамид
Содержимое желудка	20 минут	Тропикамид
	2,5 часа	Тропикамид
	6 часов	Тропикамид NЭN-(П-4-ил-М)-ФАА NЭ2ФN-(П-4-ил-М)-ПА
Ткань кишечника	20 минут	Тропикамид NЭN-(П-4-ил-М)-ФАА
	2,5 часа	Тропикамид
	6 часов	Тропикамид
Содержимое кишечника	20 минут	Тропикамид
	2,5 часа	Тропикамид
	6 часов	Тропикамид
Почки	20 минут	Тропикамид
	2,5 часа	Тропикамид
	6 часов	Тропикамид
Кровь	20 минут	Тропикамид
	2,5 часа	Тропикамид
	6 часов	Тропикамид
Лёгкие	20 минут	Тропикамид
	2,5 часа	Тропикамид
	6 часов	Тропикамид
Селезенка	20 минут	Тропикамид
	2,5 часа	Тропикамид
	6 часов	Тропикамид
Мышцы (бедренные)	20 минут	Тропикамид
	2,5 часа	Тропикамид
	6 часов	Тропикамид
Сердце	20 минут	Тропикамид
	2,5 часа	Тропикамид
	6 часов	Тропикамид
Мозг	20 минут	Тропикамид
	2,5 часа	Тропикамид
	6 часов	Тропикамид

Примечание: используемые сокращения: NЭN-(П-4-ил-М)-ФАА – N-этил-N-(пиридин-4-ил-метил)-фенилацетамид (время удерживания 9,37 мин); NЭ2ФN-(П-4-ил-М)-ПА – N-этил-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропенамид (время удерживания 9,59 мин); NЭ3АО2ФN-(П-4-ил-М)-ПА – N-этил-3-ацетокси-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропанамида (время удерживания 10,25 мин).

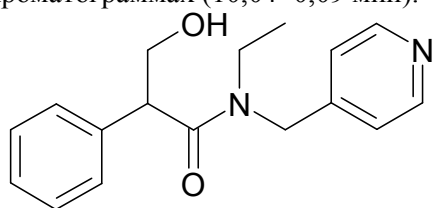
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Результаты обнаружения и идентификации тропикамида, а также близких по структуре соединений в органах и крови отравленных животных, погибших через различные промежутки времени после введения отравляющего агента в желудок, представлены в таблице 1. Как свидетельствуют полученные результаты, тропикамид через 20 мин, 2,5 часа и 6 часов после его введения присутствовал во всех исследованных органах и крови отравленных организмов.

Из приводимой таблицы также видно, что, помимо исходного отравляющего вещества, в ряде органов отравленных животных обнаруживались вещества, близкие по структуре к тропикамиду, возможно, продукты его трансформации. Так, через 20 минут после введения тропикамида в печени были найдены N-этил-N-(пиридин-4-ил-метил)-фенилацетамид (II) и N-этил-3-ацетокси-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропанамид (III), в ткани желудка – N-этил-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропенамид (IV), N-этил-N-(пиридин-4-ил-метил)-фенилацетамид, в ткани тонкого кишечника – N-этил-N-(пиридин-4-ил-метил)-фенилацетамид. Через 2,5 часа после введения тропикамида в печени присутствовали N-этил-N-(пиридин-4-ил-метил)-фенилацетамид и N-этил-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропенамид, в ткани желудка – N-этил-N-(пиридин-4-ил-метил)-фенилацетамид, N-этил-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропенамид и N-этил-3-ацетокси-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропанамид. Спустя 6 часов после введения исходного отравляющего вещества в содержимом желудка обнаруживались N-этил-N-(пиридин-4-ил-метил)-фенилацетамид и N-этил-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропенамид.

Хроматограммы тропикамида и ряда близких по структуре соединений (продуктов его трансформации), извлеченных из ткани желудка и из печени через 2,5 часа после введения отравляющего вещества, представлены на рис. 1 и 2.

Время удерживания тропикамида (I), извлеченного из биологических объектов, составляло на хроматограммах $10,04 \pm 0,09$ мин).

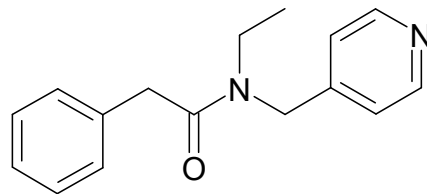


(I)

В его масс-спектре присутствовали сигналы характерных осколков (заряженных частиц) с m/Z 44, 65, 92, 121, 137, 163, 183, 209, 225, 254, 284.

Основным (интенсивность которого принимается за 100%) является осколок с m/Z 92. В масс-спектре присутствовал молекулярный ион (m/Z 284).

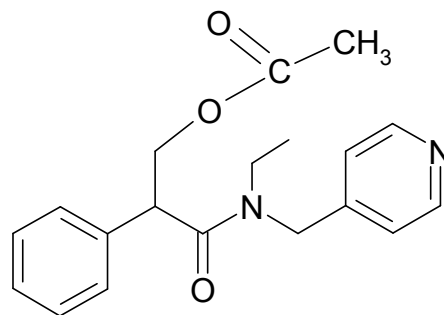
Время удерживания N-этил-N-(пиридин-4-ил-метил)-фенилацетамида (II), извлеченного из биологических объектов, составляло 9,37 мин.



(II)

В его масс-спектре присутствовали сигналы характерных осколков (заряженных частиц) с m/Z 51, 65, 80, 92, 107, 121, 135, 163, 254. Основным (интенсивность которого принимается за 100%) является осколок с m/Z 92. В масс-спектре присутствовал молекулярный ион (m/Z 254).

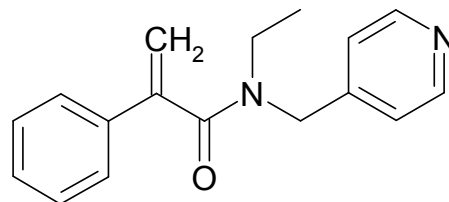
Время удерживания N-этил-3-ацетокси-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропанамид (III), найденного в биоматериале, составляло 10,25 мин.



(III)

В его масс-спектре присутствовали сигналы характерных осколков (заряженных частиц) с m/Z 65, 92, 104, 118, 135, 163, 225, 251, 266, 326. Основным (интенсивность которого принимается за 100%) является осколок с m/Z 92. В масс-спектре присутствовал молекулярный ион (m/Z 326).

Время удерживания N-этил-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропенамид (IV), найденного в биоматериале, составляло 9,59 мин.



(IV)

В его масс-спектре присутствовали сигналы характерных осколков (заряженных частиц) с m/Z 51, 65, 77, 92, 103, 131, 135, 149, 188, 251, 266. Основным (интенсивность которого принимается за 100%) является осколок с m/Z 92. В масс-спектре присутствовал молекулярный ион (m/Z 266).

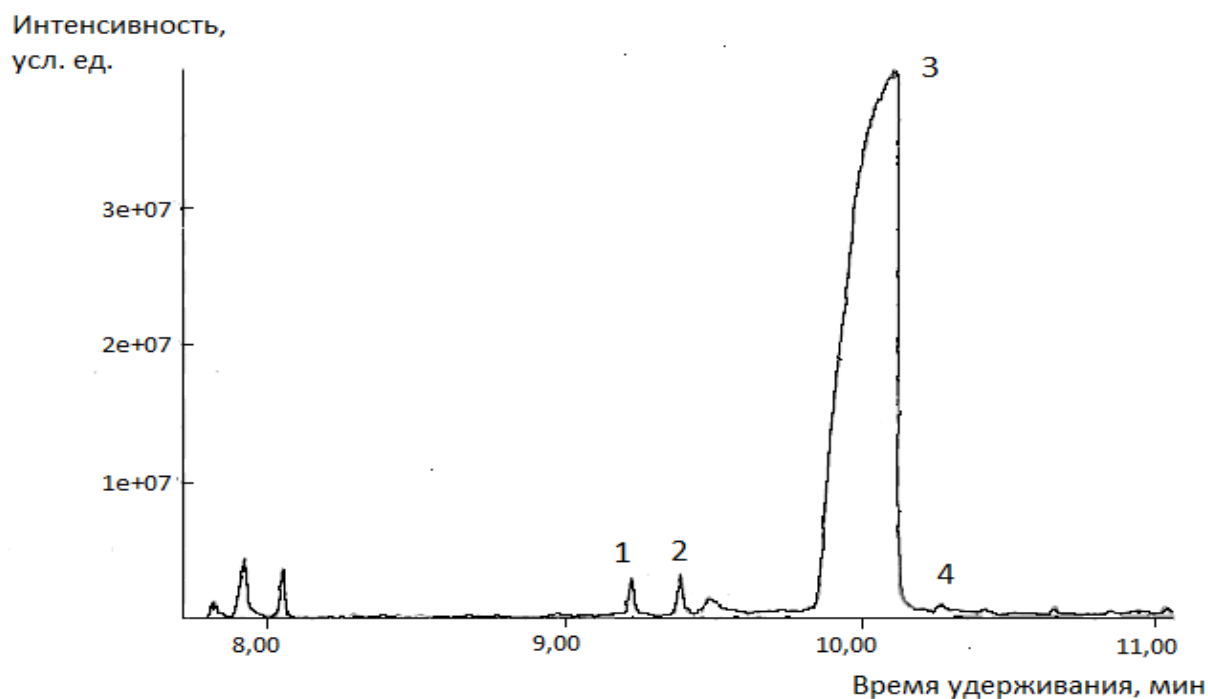


Рис. 1. Хроматограмма очищенного извлечения из ткани желудка: 1 – N-этил-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропенамид; 2 – N-этил-N-(пиридин-4-ил-метил)-фенилацетамид; 3 – тропикамид; 4 – N-этил-3-ацетокси-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропанамид.

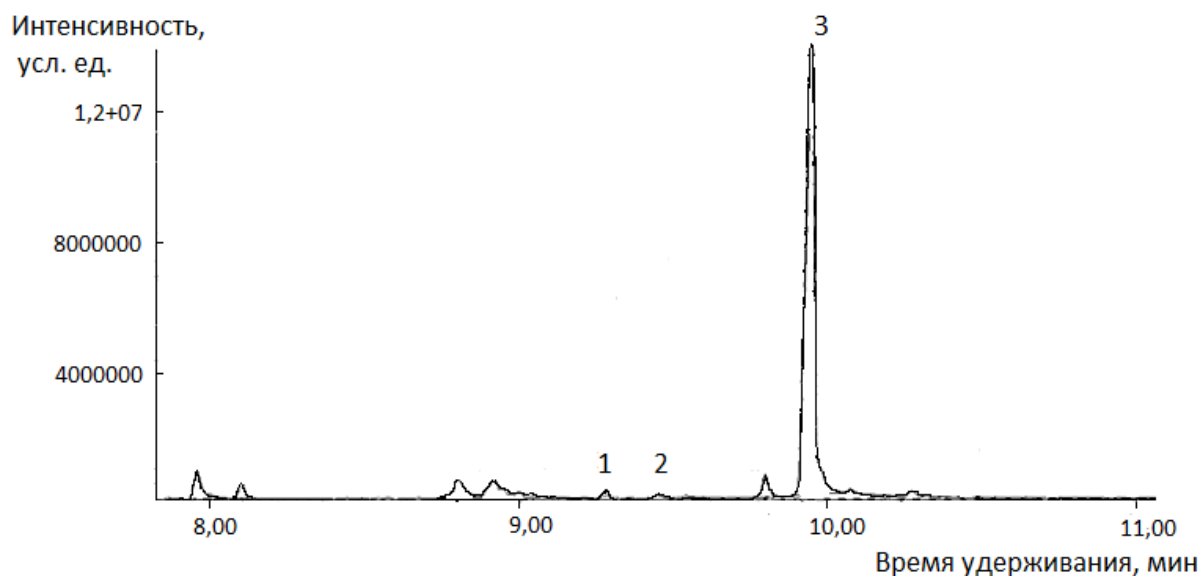


Рис. 2. Хроматограмма очищенного извлечения из ткани печени: 1 – N-этил-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропенамид; 2 – N-этил-N-(пиридин-4-ил-метил)-фенилацетамид; 3 – тропикамид.

Как свидетельствуют полученные данные, в предлагаемых условиях хроматографическая подвижность тропикамида и трех найденных в биоматериале близких к нему по структуре веществ в колонке с (5%-фенил)метилполисилоксаном уменьшается, вероятно, с ростом полярности анализируемых структур: II > IV > I > III.

При исследовании извлечений из тканей органов, содержимого желудка и кишечника, а также крови крыс, не получавших тропикамид, установлено отсутствие на газожидкостных хромато-

граммах пиков исходного токсического агента, а также близких по структуре соединений – возможных продуктов его трансформации. Отсутствие заметного сдвига базовой линии и выраженных пиков созкстрактивных веществ биоматериала с временем удерживания ≤ 11 мин свидетельствовало о достаточной эффективности предлагаемой схемы очистки извлечений из биоматериала.

Таким образом, можно заключить, что доказательство отравления тропикамидом, введенным в

желудок теплокровных, может быть проведено с использованием предлагаемой методики на основе обнаружения в органах и крови исходного токсического агента, а также ряда близких к нему по структуре соединений (N-этил-N-(пиридин-4-ил-метил)-фенилацетамида, N-этил-3-ацетокси-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропанамида и N-этил-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропанамида).

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Проведен поиск и идентификация исходного отравляющего вещества и близких по структуре продуктов его трансформации в организме теплокровных животных (крысы) через различные промежутки времени после однократного введения 1300 мг/кг тропикамида в желудок.

2. Установлено, что во всех исследованных полых и паренхиматозных органах, а также крови лабораторных животных, взятых на анализ через 20 мин, 2,5 часа и 6 часов после введения тропикамида, присутствует исходное отравляющее вещество.

3. В печени, тканях желудка и кишечника, а также содержимом желудка отравленных организмов обнаруживались близкие по структуре к тропикамиду соединения, идентифицированные как N-этил-N-(пиридин-4-ил-метил)-фенилацетамид, N-этил-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропен-амид и N-этил-3-ацетокси-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропанамида.

4. Доказательство отравления тропикамидом может основываться на обнаружении в отравленных организмах как самого отравляющего агента, так и возможных продуктов его трансформации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дворская О.Н., Карпенко Ю.Н., Тумилович Е.Ю., Порсева Н.Ю. О проблеме немедицинского использования лекарственного препарата тропика-

- мид в Пермском крае // Медицинская экспертиза и право. – 2011. – № 1. – С. 17-19.
2. Коваленко Н.Я., Мацевский Д.Д., Решетняк В.К. Влияние селективной блокады М4-холинорецепторов тропикамидом на кровоснабжение мозга, непарных органов спланхического бассейна и нижних конечностей интактных крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156, № 12. – С. 697-700.
3. Лаврентьева А.В., Банникова Г.А., Мелентьев А.Б. Определение тропикамида в крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором // Проблемы экспертизы в медицине. – 2011. – Т. 11, № 1-2. – С. 16-18.
4. Тумилович Е.Ю., Крылова Е.В., Карпенко Ю.Н., Дворская О.Н. Определение оптимальных условий обнаружения тропикамида в биологических жидкостях методом тонкослойной хроматографии // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. – 2011. – № 8. – С. 133-134.
5. Шорманов В.К., Галушкин С.Г., Коваленко Е.А., Терских А.П. Изучение особенностей распределения карбофурана в организме теплокровных животных // Судебно-медицинская экспертиза. – 2015. – Т. 58, № 1. – С. 40-43.
6. Bersani F.S., Corazza O., Simonato P., Mylokosta A., Levari E., Lovaste R., Schifano F. Drops of madness? Recreational misuse of tropicamide collyrium; early warning alerts from Russia and Italy // General Hospital Psychiatry. – 2013. – Vol. 35, N 5. – P. 571-573.
7. Galmier M.J., Frasey A.M., Meski S., Beyssac E., Petit J., Aiache J.M., Lartigue C. High-performance liquid chromatographic determination of phenylephrine and tropicamide in human aqueous humor // Biomed Chromatogr. – 2000. – Vol. 14, N 3. – P. 202-204.
8. Shoaibi Z.A., Gouda A.A. Extractive spectrophotometric method for the determination of tropicamide // J. Young Pharmacists. – 2012. – Vol. 4. – P. 42-48.
9. Souri E., Amanlou M., Shahbazi S., Bayat M. Development and Validation of a Rapid Derivative Spectrophotometric Method for Determination of Tropicamide in Eye Drops/Iranian // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2010. – Vol. 6, N 3. – P. 171-178.