



Структурная идентификация и сравнительная оценка содержания метаболитов инкапаситанта BZ в моче и плазме крови крыс

И.И. Коваленко, А.С. Ярлыченко, Я.В. Ставитская, Н.А. Колосова,
И.В. Рыбальченко, А.М. Григорьев[✉]

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации,
111024, Российская Федерация, г. Москва, проезд Энтузиастов, д. 19
✉ e-mail: 27nc_1@mil.ru

Основные моменты

- в зоне специальной военной операции отмечается применение украинскими вооруженными и террористическими формированиями нелетальных отравляющих веществ, что является нарушением Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и его уничтожении (КЗХО);
- разработан хромато-масс-спектрометрический способ, позволяющий установить факт отравления BZ и его аналогами по их метаболитам в моче и плазме крови.

Актуальность. Начиная с 2022 г., в зоне СВО дважды фиксировались случаи обнаружения вещества EA-3167, структурного и функционального аналога инкапаситанта BZ, включенного в Список 2 КЗХО. Отмечены случаи отравления российских военнослужащих. Несмотря на давнее открытие самого BZ, сведения о его метаболизме и возможных маркерах отравления, опубликованные в открытых источниках, крайне неполны и недостаточны.

Цель работы – обнаружение и структурная идентификация метаболитов BZ в моче и плазме крови крыс; оценка относительного содержания BZ и его метаболитов.

Материалы и методы. Жидкостная и газовая хроматография-масс-спектрометрия высокого разрешения. Оценка относительного содержания метаболитов BZ проводилась исходя из величин интенсивностей (площадей) пиков метаболитов в условиях жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии высокого разрешения. Определялись характеристики метаболитов, характерных для отравления BZ.

Результаты. В моче и плазме крови крыс предположительно идентифицировали более 40 метаболитов BZ, образованных в результате окислительных и (частично) гидролитических модификаций исходной молекулы. Структуры окисленных метаболитов фазы I содержали до четырех дополнительных атомов кислорода, входящих в состав гидроксильных групп на фенильных остатках и N-оксида. Метаболиты фазы I подвержены интенсивному конъюгированию с образованием O-метильных и глюкуронидированных форм, а также их комбинаций. Было найдено, что содержание ряда метаболитов в моче (в том числе глюкуронида дигидроксилированного метилированного метаболита) увеличивалось вплоть до 24 ч после экспонирования. Неизмененный BZ присутствовал в моче крыс лишь в небольших концентрациях.

Выводы. Для подтверждения отравления BZ методом хроматографии-масс-спектрометрии наиболее удобны моногидроксилированные, N-окисленные и дигидроксилированные метилированные формы. При значительном времени после отравления рекомендуется обнаружение глюкуронидов моногидроксилированных и дигидроксилированных метилированных метаболитов.

Практическая значимость работы. Разработанный подход позволяет объективно подтверждать факт отравления инкапаситантом BZ и его аналогами по стабильным метаболитам в биосредах. Результаты работы имеют важное прикладное значение для химико-аналитического обеспечения контроля за соблюдением КЗХО и судебно-медицинской экспертизы.

Ключевые слова: BZ; EA-3167; газовая хроматомасс-спектрометрия; жидкостная хромато-масс-спектрометрия; инкапаситанты; метаболиты; крысы; специальная военная операция; точные массы

Для цитирования: Коваленко И.И., Ярлыченко А.С., Ставитская Я.В., Колосова Н.А., Рыбальченко И.В., Григорьев А.М. Структурная идентификация и сравнительная оценка содержания метаболитов инкапаситанта BZ в моче и плазме крови крыс. Вестник войск РХБ защиты. 2025;9(4):345-369. EDN:mingwu.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2025-9-4-345-369>

© И.И. Коваленко, А.С. Ярлыченко, Я.В. Ставитская, Н.А. Колосова, И.В. Рыбальченко, А.М. Григорьев, 2025

Вестник войск РХБ защиты. 2025. Том 9. № 4

Коваленко И.И., Ярлыченко А.С., Ставитская Я.В., Колосова Н.А., Рыбальченко И.В., Григорьев А.М.
Kovalenko I.I., larlychenko A.C., Stavitskaya Y.V., Kolosova N.A., Rybalchenko I.V., Grigoryev A.M.

Прозрачность финансовой деятельности: авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов: И.В. Рыбальченко является членом редколлегии журнала (с 2017 г.). А.М. Григорьев является членом редколлегии журнала (с 2024 г.). Это не повлияло на процесс рецензирования и окончательное решение.

Использование искусственного интеллекта: авторы не использовали.

Финансирование: федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации (27 НЦ МО РФ).

Поступила 10.10.2025 г. После доработки 16.11.2025 г. Принята к публикации 27.12.2025 г.

Structural identification and comparative assessment of the content of BZ incapacitant metabolite in rat urine and blood plasma

Irina I. Kovalenko, Aleksey S. Iarlychenko, Jana V. Stavitskaya, Nataliya A. Kolosova,
Igor V. Rybalchenko, Andrej M. Grigoryev[✉]

27 Scientific Center Named after Academician N.D. Zelinsky
of the Ministry of Defence of Russian Federation
Entuziastov Proezd, 19, Moscow 111024, Russian Federation
✉ e-mail: 27nc_1@mil.ru

Highlights

- use of non-lethal chemical agents by Ukrainian armed and terrorist formations has been documented in the Special Military Operation zone, constituting a violation of the Chemical Weapons Convention;
- a chromatographic-mass spectrometric method has been developed to confirm exposure to BZ and its analogs through identification of their metabolites in urine and blood plasma.

Relevance. Since 2022, two instances of EA-3167 detection have been recorded in the SMO zone - a structural and functional analog of the incapacitating agent BZ listed in Schedule 2 of the CWC. Cases of intoxication among Russian military personnel have been reported. Despite BZ being known for decades, information about its metabolism and potential exposure markers in open sources remains extremely limited and insufficient.

Purpose of the study is to detect and structurally identify BZ metabolites in rat urine and blood plasma; to assess the relative content of BZ and its metabolites.

Materials and Methods. High-resolution liquid and gas chromatography-mass spectrometry. Evaluation of relative metabolite content was based on peak intensity (area) measurements under HPLC-HRMS conditions. Characteristics of metabolites specific to BZ exposure were determined.

Results. Over 40 BZ metabolites formed through oxidative and (partially) hydrolytic modifications.

Conclusion. For of the parent molecule were tentatively identified in rat urine and plasma. Structures of Phase I oxidized metabolites contained up to four additional oxygen atoms incorporated as hydroxyl groups on phenyl residues and N-oxide. Phase I metabolites undergo intensive conjugation forming O-methylated and glucuronidated forms, and their combinations. Levels of several metabolites in urine (including glucuronide of dihydroxylated methylated metabolite) increased up to 24 hours post-exposure. Unchanged BZ was present in rat urine only in minor concentrations. forensic confirmation of BZ exposure using chromatography-mass spectrometry, monohydroxylated, N-oxidized, and dihydroxylated methylated forms are most suitable. When significant time has passed after exposure, detection of glucuronides of monohydroxylated and dihydroxylated methylated metabolites is recommended.

Practical significance of the work. The developed approach allows for the objective confirmation of poisoning by the incapacitating agent BZ and its analogues through the detection of stable metabolites in biological samples. The results are of high practical importance for chemical-analytical support in monitoring compliance with the Chemical Weapons Convention and for forensic medical examination.

**Структурная идентификация и сравнительная оценка содержания метаболитов инкапаситанта BZ в моче...
Structural identification and comparative assessment of the content of BZ incapacitant metabolite in rat urine...**

Keywords: accurate masses; BZ; EA-3167; gas chromatography-mass spectrometry; incapacitant; liquid chromatography-mass spectrometry; metabolites; rat

For citation: Kovalenko I.I., Iarlychenko A.C., Stavitskaya Y.V., Kolosova N.A., Rybalchenko I.V., Grigoryev A.M. Structural identification and comparative assessment of the content of BZ incapacitant metabolites in rat urine and blood plasma. Journal of NBC Protection Corps. 2025;9(4):345–369. EDN: mingwu.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2025-9-4-345-369>

Financial disclosure: The authors have no financial interests in the submitted materials or methods.

Conflict of interest statement: I.V. Rybalchenko has been a member of the Journal Editorial Board (since 2017). A.M. Grigoryev has been a member of the Journal Editorial Board (since 2024). These facts have not affected review process and final decision.

AI use: The authors did not use artificial intelligence.

Funding: 27 Scientific Centre Named after Academician N.D. Zelinsky of the Ministry of Defence of the Russian Federation (27 SC MD RF).

Received October 10, 2025. Revised November 16, 2025. Accepted December 27, 2025.

В последние годы в ходе локальных конфликтов воюющими сторонами предпринимаются попытки обхода строгих ограничений, установленных Конвенцией о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении (КЗХО)¹. При этом наблюдается повышение интереса среди криминальных и террористических кругов к неletalным отравляющим веществам (OB). В частности, к ним относятся OB психохимического действия, воздействующие на определенные биохимические процессы, связанные с функционированием периферической и центральной нервной системы человека.

Одним из таких веществ является 3-хинуклидинил бензилат (BZ, QNB), синтезированный в 50-годах прошлого века фармацевтической компанией Hoffman-La Roche в качестве возможного спазмолитического средства, рисунок 1. Впоследствии в 1960-х гг. это вещество было принято на вооружении армии США в качестве OB психохимического действия под шифром BZ [1]. По терминологии КЗХО вещество BZ относится к инкапаситантам (incapacitants, «выводящие из строя») и включено в Список 2 приложения по химикатам к тексту Конвенции².

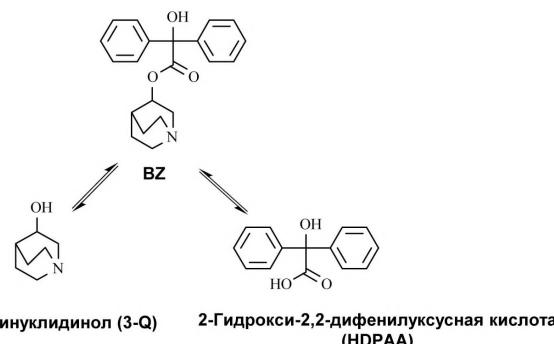


Рисунок 1 – Структурные формулы BZ и продуктов его гидролиза [3]

Figure 1: The structural formulas of BZ and its hydrolysis products [3]

Токсическое действие BZ обусловлено блокированием процесса связывания ацетилхолина с мускариновыми холинэргическими рецепторами³ (константа ассоциации КА для BZ составляет $5,28 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ [2], что более, чем в 30 раз превышает константу ассоциации для атропина). BZ – антагонист мускариновых рецепторов, а симптомы отравления включают сухость во рту, тахикардию, спутанность

¹ OPCW. Annex of Chemicals. Schedule 2. URL: <https://www.opcw.org/chemical-weapons-convention/annexes/annex-chemicals/schedule-2> (дата обращения: 12.08.2025).

² OPCW. Annex of Chemicals. Schedule 2. URL: <https://www.opcw.org/chemical-weapons-convention/annexes/annex-chemicals/schedule-2> (дата обращения: 12.08.2025).

³ National Research Council (US) Panel on Anticholinesterase Chemicals; National Research Council (US) Panel on Anticholinergic Chemicals. Possible Long-Term Health Effects of Short-Term Exposure to Chemical Agents: Vol. 1. Anticholinesterases and Anticholinergics. Washington (DC): National Academies Press (US); 1982. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK217774/> (дата обращения: 18.09.2025).

Коваленко И.И., Ярлыченко А.С., Ставитская Я.В., Колосова Н.А., Рыбальченко И.В., Григорьев А.М.
Kovalenko I.I., Iarlychenko A.C., Stavitskaya Y.V., Kolosova N.A., Rybalchenko I.V., Grigoryev A.M.

сознания, потерю ориентации, гиперактивное дезорганизованное поведение, бессвязную речь, галлюцинации [1, 3]. В зависимости от дозы отдельные признаки поражения сохраняются до нескольких суток. Исследование действия BZ на человека с использованием добровольцев осуществлялось в армии США в период 1955–1975 гг. [4].

BZ вызывает поражение при ингаляционном, пероральном и венозно-артериальном поступлении в организм. Выводящая из строя доза при вдыхании аэрозоля (IC_{50}) составляет 60,1 мг·мин/ m^3 ⁴. Поведенческая и когнитивная дисфункция наблюдается при пероральном введении 3–7 мкг/кг, при этом рассчитанная для человека LD_{50} составляет ~5 мг/кг [3].

Реальная опасность применения BZ в боевых условиях привела к принятию на снабжение Советской армии в 1973 г. индикаторной трубы ИТ-46 для определения аэрозоля BZ в воздухе, в рецептуре которой использовалась цветная реакция на третичный азот с реагентом Драгендорфа⁵.

Высокая аффинность к мускариновым холинергическим receptorам характерна и для структурных аналогов BZ [5, 6], что привело к использованию этих соединений в nesterases and Anticholinergics. Washington (DC): National Academies Press (US); 1982. URL: веществом EA-3167, являющимся функциональным и структурным аналогом BZ [11, 12], а в 2023 г. у диверсантов ВСУ были изъяты ампулы, содержащие это вещество⁶.

В солевой форме BZ заметно растворим в воде, хотя растворимость зависит от вида противоиона. Как сложный эфир, BZ подвержен гидролизу в водной среде. В кислых растворах (до pH~5) BZ весьма стабилен (период полуразложения более 10000 ч), но при снижении кислотности скорость гидролиза быстро возрастает, и в физиологических условиях (37 °C, pH 7,4) эта величина примерно равна 95 ч [3]. Описанные свойства BZ и характер продуктов его гидролиза – 3-хинуклидинола (3-Q) и 2-гидрокси-2,2-дифенилуксусной кислоты (HDPAА) определяли стратегию анализа с целью выявления применения BZ и/или определения его содержания в техно-

генных объектах и в объектах окружающей среды. В ранних работах [13, 14] применяли метод ГХ-МС, который требовал проведения дериватизации, обычно заключавшейся в триметилсилировании (TMS). В недавних работах [15, 16] было описано применение новых дериватизирующих агентов для определения 3-Q и HDPAА. Почти одновременно с публикацией работ по ГХ-МС BZ и продуктов его гидролиза появились сообщения, предлагающие применение метода ЖХ-МС [17, 18]. Все перечисленные публикации фокусировались на оптимизации методов подготовки проб и условий инструментального анализа трех известных и хорошо охарактеризованных соединений, определяемых в небиогенных средах.

Значительно сложнее выглядит задача, требующая диагностического подтверждения отравления BZ и/или его аналогами, включающая обнаружение как самого неизмененного соединения, так и возможных его маркеров в биологических объектах – в первую очередь, в моче и крови. В конце прошлого века, ввиду недостаточной разработанности и малой доступности ЖХ-МС ее решали методом ГХ-МС [19–21]. Тогда же было отмечено, что BZ подвержен интенсивному метаболизму и его содержание в моче очень мало, но среди определяемых метabolитов были названы только продукты гидролиза и, возможно, глюкуронид BZ. Поиск остальных возможных метabolитов был затруднен ограничениями метода ГХ-МС.

Согласно нашим данным, на протяжении длительного времени после публикации работ [19–21] (около 30 лет) в доступных источниках не было сделано никаких публикаций по детальному исследованию метаболизма BZ с применением метода ЖХ-МС. Эта ситуация приводила к ошибочному мнению об ограниченности списка метabolитов только двумя–тремя соединениями. Лишь недавно (2020 г.) была опубликовано сообщение о гораздо более тщательном исследовании метаболизма BZ для крыс и *in vitro* [22]. Авторы привели список ряда мочевых метabolитов фазы I, имеющих гидролизную и окислительную природу и метabolитов фазы II –

⁴ National Research Council. 2013. *Acute Exposure Guideline Levels for Selected Airborne Chemicals: Vol. 14*. Washington (DC): National Academies Press (US); 1982. URL: <https://doi.org/10.17226/18313> (дата обращения: 05.09.2025).

⁵ Сизиков СН, ред., Смирнов АО, Щеглов ОФ, Рыбальченко ИВ и др. Индикация, технические средства химической, неспецифической биологической разведки и химического контроля. Учебное пособие. ВА РХБЗ, Кострома; 2009. 491 с.

Sizikov SN, Ed, Smirnov AO, Shcheglov OF, Rybalchenko IV, et al. *Indication, technicalmeans of chemical, non-specific biological exploration and chemical control*. Training manual. NBC Protection Corps, Kostroma; 2009. 491 p.

⁶ URL: https://vk.com/video-147097724_456242348 (дата обращения: 12.08.2025).

Структурная идентификация и сравнительная оценка содержания метаболитов инкапаситанта BZ в моче... Structural identification and comparative assessment of the content of BZ incapacitant metabolite in rat urine...

продуктов глюкуронидирования и метилирования. К сожалению, этот список не содержал данных, касающихся наблюдаемого содержания (площадей пиков) найденных метаболитов, что не позволяет сделать правильный выбор биомаркеров BZ и оптимизировать условия анализа. Поскольку работа [22] основана на применении ЖХ-МС, то она не содержит никакой информации о ГХ-МС характеристиках метаболитов BZ, которая необходима при учете сравнительной простоты и дешевизны этого метода.

Вообще, следует отметить несомненный интерес, проявляемый исследователями в отношении BZ в недавнее время: кроме исследования мочевого метabolизма, та же группа представила работы по определению BZ в плазме крови крыс и исследованию токсико-кинетики [23, 24].

Цель работы – обнаружение и структурная идентификация метаболитов BZ в моче и плазме крови крыс, а также оценка относительного содержания метаболитов BZ.

Для достижения данной цели:

- проведена оценка относительного содержания метаболитов BZ, включая степень глюкуронидирования исходя из величин интенсивностей (площадей) пиков метаболитов в условиях ЖХ-МС высокого разрешения (ЖХ-МСВР);
- определены ГХ-МС характеристики некоторых метаболитов BZ и предложены способы подготовки проб при анализе мочи.

Материалы и методы

Реактивы и материалы. В работе пользовались ацетонитрилом (для ВЭЖХ, Scharlab, S.L., Испания), формиатом аммония и му-

равиной кислотой (для ВЭЖХ, Sigma-Aldrich, Германия), бис(триметилсилил) трифторацетамид с добавкой trimethylchlorosilane (BSTFA + 1% TMCS, ООО «Хевел Технолоджи», Россия). Деионизированную воду (18,2 МОм) получали с помощью системы очистки Milli-Q Advantage A10 (Merck, Германия). Патроны для твердофазной экстракции были марки ISOLUTE C18(EC), 100 мг × 1 мл (Biotage, Швеция). Все другие реагенты и растворители (квалификация не ниже х.ч.) были приобретены в Химмед (Россия).

Экспонирование крыс. В эксперименте использовали пять беспородных крыс-самцов с массой тела в диапазоне 269–343 г. За сутки до экспонирования животных переставали кормить при свободном доступе к воде. BZ вводили в виде раствора в диметилсульфоксиде; для получения холостых образцов использовали растворитель. Общая схема экспонирования и отбора приведена в таблице 1.

Кровь стабилизировали ЭДТА и центрифугировали для получения плазмы. До проведения анализа (не более недели) пробы хранили при 4 °C.

Условия содержания экспериментальных животных и проведения экспонирования соответствовали ГОСТ 33216-2014⁷.

Подготовка проб. Для ЖХ-МСВР к моче или плазме (100 мкл) добавляли холодный ацетонитрил (500 мкл), перемешивали и помещали в морозильную камеру (15 мин, -15 °C). Отбирали верхний слой жидкости (450 мкл), упаривали при температуре не выше 45 °C и сухой остаток растворяли в смеси ацетонитрила и воды (100 мкл, 1:9 об.).

Таблица 1 – Условия экспонирования крыс
Table 1. Conditions for the administration of BZ to rats

№ / No	Доза BZ, мг/кг / BZ dose, mg/kg	Концентрация, мг/мл / Concentration, mg/mL	Объект и время отбора (ч) / Object and time of sampling (h)			
			Моча / Urine		Кровь / Blood	
Внутрижелудочное введение / Intraoperative administration						
1	10	3	4	8	24	24
2	10	3	4	8	24	24
Внутривенное введение / Intravenous administration						
3	2	2	4	8	24	24
4	2	2	-	-	-	0,5
5	-	-	4	8	24	24

⁷ ГОСТ 33216–2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. URL: <https://internet-law.ru/gosts/gost/62388/> (дата обращения: 10.01.2024).

Коваленко И.И., Ярлыченко А.С., Ставитская Я.В., Колосова Н.А., Рыбальченко И.В., Григорьев А.М.
Kovalenko I.I., Iarlychenko A.C., Stavitskaya Y.V., Kolosova N.A., Rybalchenko I.V., Grigoryev A.M.

Этот способ позволяет минимизировать искажение состава проб.

Для ГХ-МС мочу (600 мкл) подщелачивали водным аммиаком до pH 9–10 и экстрагировали этилацетатом (1 мл). Органическую фазу упаривали досуха и растворяли остаток в этилацетате (100 мкл) или дериватизировали. Дериватизацию проводили двумя способами. При триметилсилировании (TMS) сухой остаток растворяли в смеси этилацетата и BSTFA+1% TMCS (100 мкл, 1:1 об.) с последующим нагреванием (60 °C, 20 мин). При ацетилировании раствор остатка в смеси уксусного ангирида и пиридина (100 мкл, 1:1 об.) нагревали (70 °C, 20 мин), далее раствор упаривали досуха и остаток растворяли в этилацетате (100 мкл).

Твердофазную экстракцию проводили после очистки патрона (2 мл метанола) и кондиционирования (2 мл воды, подщелоченной водным аммиаком до pH 9–10). Пробу (0,6 мл мочи) загружали после подщелачивания до pH 9–10. Далее патрон промывали водой (pH 9–10), сушили под умеренным вакуумом (2 мин) и элюировали ацетоном (1 мл). Полученную смесь в ацетоне упаривали досуха и остаток обрабатывали так же, как и при жидкостной экстракции. Присутствие анализаторов в смыках контролировали методом ЖХ-МСВР.

Жидкостная хроматография-масс-спектрометрия. Использовали жидкостной хроматограф Vanquish, связанный с масс-спектрометром высокого разрешения типа квадруполь-орбитальная ионная ловушка Orbitrap Exploris 480 (Thermo Scientific, США). Пробы разделяли на колонке Acclaim RSLC 120 C18 (100 мм×2,1 мм, 2,2 мкм, Thermo) двумя фазами А и Б в градиентном режиме согласно программе: начальные условия 1% Б, 0,4 мин (1% Б), 3,4 мин (21% Б), 7,4 мин (29% Б), 12,4 мин (64% Б), 14,4 мин (99% Б), 16,4 мин (99% Б), 16,5 мин (1% Б), 19 мин (1% Б). Обе фазы, А (1% об. ацетонитрила в воде) и Б (1% об. воды в ацетонитриле) содержали 5 мМ формиата аммония и 0,1% об. муравьиной кислоты. Скорость потока элюента была 0,5 мл/мин, температура колонки 40 °C, объем вводимой пробы 5 мкл.

Для гидрофильной хроматографии (HILIC) применяли колонку Acquity BEH Amide (150 мм×2,1 мм, 1,7 мкм, Waters, США) при элюировании теми же фазами согласно программе: начальные условия 95% Б, 0,4 мин (95% Б), 7,4 мин (50% Б), 8,4 мин (50% Б), 8,5 мин (95% Б), 13 мин (95% Б). Скорость потока была 0,4 мл/мин и остальные условия те же. Перед введением пробы мочи разводили ацетонитрилом в соотношении 1:99 об.

Масс-спектрометр работал в режиме нагреваемой электрораспылительной ионизации (ЭРИ) с источником OptaMax NG. Потоки азота в каналах завесочного (Sheath), дополнительного (Aux) и продувочного (Sweep) газа были 50, 10 и 1 усл. ед. соответственно; температуры распыления и трубы переноса ионов, 350 и 325 °C соответственно; напряжение при распылении в положительном и отрицательном режимах, 3500 и 2500 В соответственно. Азот также использовали для высокоэнергетичной диссоциации, индуцируемой соударением (HCD). Масс-спектрометрическое разрешение составляло 60000 и 15000 для режимов MC¹ и MC² соответственно.

Для оценки содержания метаболитов использовали площади пиков на хроматограммах точных масс протонированных (депротонированных) молекул. Следует отметить, что такая оценка не является строго количественной, но позволяет проводить ориентировочные сравнения содержания близких по структуре анализаторов в идентичных условиях определения.

Газовая хроматография-масс-спектрометрия. Для анализа проб данным методом применяли две системы.

Первую состояла из газового хроматографа 8890, соединенного с моноквадрупольным масс-спектрометром 5977B (Agilent Technologies, США). Пробы разделяли на колонке HP-5ms UI (30 м×0,25 мм×0,25 мкм, Agilent) согласно температурной программе: 50 °C (1 мин), 100 °C (99°/мин, 1 мин), 300 °C (35°/мин, 12 мин). Скорость потока газа-носителя (гелий, постоянный поток) была 1 мл/мин, температура испарителя (режим ввода без деления потока) 270 °C, объем вводимой пробы 1 мкл. Масс-спектрометр работал в режиме электронной ионизации (ЭИ) с высокоэффективным ионным источником (HES, 70 эВ) при температурах источника и квадруполя 230 и 150 °C соответственно. Эту систему использовали для общего поиска метаболитов.

Вторую систему применяли для подтверждения структурной идентификации. Она состояла из хроматографа Trace 1610, соединенного с масс-спектрометром Orbitrap Exploris GC 240 типа квадруполь-орбитальная ионная ловушка (Thermo). Пробы разделяли на колонке TR-5ms (30 м×0,25 мм×0,25 мкм, Thermo) при той же температурной программе, скорости потока газа-носителя и условиями ввода проб. Масс-спектрометр был настроен на режим электронной ионизации (70 эВ) при температуре источника 280 °C и разрешении 60000.

**Структурная идентификация и сравнительная оценка содержания метаболитов инкапаситанта BZ в моче...
Structural identification and comparative assessment of the content of BZ incapacitant metabolite in rat urine...**

Индексы удерживания измеряли относительно смеси n-алканов в диапазоне $C_{10}-C_{36}$.

Результаты и обсуждение

Общие характеристики мочевого метаболизма BZ. Всего обнаружили около 60 метаболитов BZ, и для дальнейшего детального рассмотрения выбраны только наиболее актуальные соединения по критериям высокой интенсивности и структурного разнообразия, рисунок 2. Все идентифицированные соединения разделены на группы согласно основной метаболической модификации: в фазе I это гидролиз и последовательное окисление, в фазе II – глюкуронидирование и метилирование.

Ранее мы отмечали, что метаболическому окислению подвержены, в первую очередь, алифатические остатки ксенобиотика, в то время как окисление (гидроксилирование) ароматических остатков затруднено [12]. Так, для EA-3167 наблюдали окисление преимущественно цикlopентильного, а не фенильного остатка. Окисление третьего остатка – хинуклидина – протекало в основном после цикlopентильного остатка. В отличие от EA-3167, молекула BZ имеет две фенильных группы, и алифатическая часть представлена только хинуклидиновым остатком.

В исследуемой моче крыс были обнаружены метаболиты BZ, содержащие до пяти дополнительных атомов кислорода, причем наиболее интенсивными были однократно и двукратно окисленные метаболиты. При увеличении числа приобретенных атомов кислорода общая интенсивность метаболитов быстро снижается (в сотни раз для окисленного пятикратно). Пятикратно окисленные метаболиты не рассматривали.

Структурное отличие BZ от EA-3167 выражается в интенсивном метаболизме фазы II: глюкуронидировании и метилировании. Все рассмотренные полигидроксилированные метаболиты метилированы однократно; содержание полиметилированных метаболитов было незначительным. Метилированные метаболиты могут быть дополнительно глюкуронидированы и, следовательно, являться продуктами двукратного прохождения фазы II метаболизма. Сульфатированные метаболиты

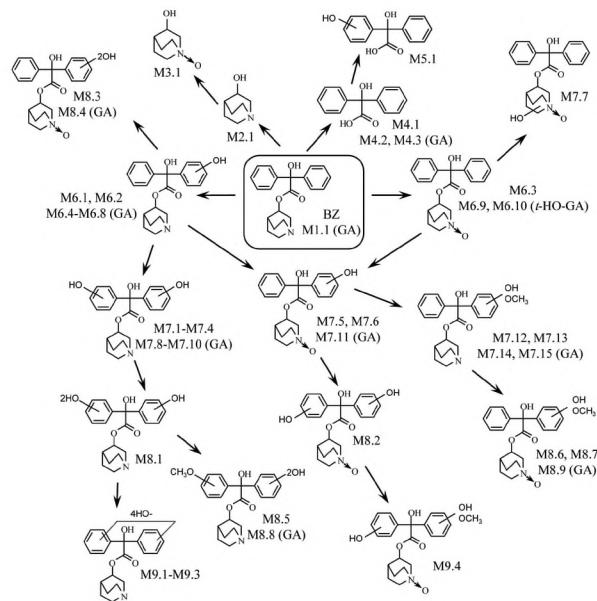


Рисунок 2 – Общая схема образования мочевых метаболитов BZ для крыс (GA – глюкуронид) (данные авторов)

Figure 2: General scheme of formation of urinary BZ metabolites in rats (GA, glucuronide) (authors' data)

литы фазы II были найдены также, но их интенсивность невелика.

ЖХ-МСВР характеристики идентификации метаболитов BZ для режима МС¹ перечислены в таблице 2. Результаты внутренней нормировки (%) по площадям пиков метаболитов для каждого образца мочи приведены в таблице на рисунке 3. Эти данные ограничены нижним пределом 2%.

Неизмененный BZ, продукты гидролиза и возможного окисления. При фрагментации протонированная молекула BZ отщепляет воду за счет третичной гидроксильной группы (ион с m/z 320, рисунок 4A), и этот процесс является общим для большинства рассмотренных соединений. Элиминирование муравьиной кислоты (ион с m/z 292) можно объяснить только внутримолекулярной перегруппировкой. Масс-спектр BZ весьма характеристичен. Ионы с m/z 209 и 183 соответствуют остатку гидроксидифенилоксоэтана и продукту элиминирования CO, соответственно. Ион с m/z 128 является про-

Таблица 2 – ЖХ-МСВР характеристики BZ и его метаболитов
Table 2. LC-HRMS characteristics of BZ and its metabolites

Метаболит (вещество) / Metabolite(substance)	Метаболическая реакция / Metabolic reaction	Брутто-формула / Brutto formula	Теор. m/z / Calc. m/z	$\Delta m/z$	RT, мин / RT, min
BZ	-	$C_{21}H_{23}NO_3$	338,1751	-0,3	6,61
M1.1	Глюкуронидирование / Glucuronidation	$C_{27}H_{31}NO_9$	514,2072	-1,1	6,31

Продолжение таблицы 2

Метаболит (вещество) / Metabolite(substance)	Метаболическая реакция / Metabolic reaction	Брутто-формула / Brutto formula	Теор. m/z / Calc. m/z	Δ m/z	RT, мин / RT, min
BZ	-	C ₂₁ H ₂₃ NO ₃	338,1751	-0,3	6,61
M1.1	Глюкуронидирование / Glucuronidation	C ₂₇ H ₃₁ NO ₉	514,2072	-1,1	6,31
M2.1 (3-Q)	Гидролиз / Hydrolysis	C ₇ H ₁₃ NO	128,1070	-0,1	0,52
M3.1 (3-Q N-оксид)	Гидролиз+N-окисление / Hydrolysis + N-oxidation	C ₇ H ₁₃ NO ₂	144,1019	-0,4	0,54
M4.1 (HDPAA)	Гидролиз / Hydrolysis	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	227,0714	0,5	9,07
M4.2	Гидролиз+ GA / Hydrolysis + GA	C ₂₀ H ₂₀ O ₉	403,1035	-0,9	6,60
M4.3	Гидролиз+ GA / Hydrolysis + GA	C ₂₀ H ₂₀ O ₉	403,1035	-0,8	6,94
M5.1	Гидролиз +гидроксилирование / Hydrolysis + hydroxylation	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	243,0663	-0,1	5,81
M6.1	Гидроксилирование / Hydroxylation	C ₂₁ H ₂₃ NO ₄	354,1700	-1,3	4,91
M6.2	Гидроксилирование / Hydroxylation	C ₂₁ H ₂₃ NO ₄	354,1700	-0,8	5,05
M6.3	N-окисление / N-oxidation	C ₂₁ H ₂₃ NO ₄	354,1700	-1,1	6,77
M6.4	Гидроксилирование + GA / Hydroxylation + GA	C ₂₇ H ₃₁ NO ₁₀	530,2021	-1,7	4,09
M6.5	Гидроксилирование + GA / Hydroxylation + GA	C ₂₇ H ₃₁ NO ₁₀	530,2021	-1,4	4,30
M6.6	Гидроксилирование + GA / Hydroxylation + GA	C ₂₇ H ₃₁ NO ₁₀	530,2021	-1,6	4,33
M6.7	Гидроксилирование + GA / Hydroxylation + GA	C ₂₇ H ₃₁ NO ₁₀	530,2021	-1,6	4,84
M6.8	Гидроксилирование + GA/ Hydroxylation + GA	C ₂₇ H ₃₁ NO ₁₀	530,2021	-0,2	4,97
M6.9	N-окисление+ GA (трет-HO-) / N-oxidation + GA (tert-HO-)	C ₂₇ H ₃₁ NO ₁₀	530,2021	-0,9	5,82
M6.10	N-окисление+ GA (трет-HO-) / N-oxidation + GA (tert-HO-)	C ₂₇ H ₃₁ NO ₁₀	530,2021	-0,9	5,89
M7.1	Дигидроксилирование / Dihydroxylation	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	370,1649	-0,9	3,63
M7.2	Дигидроксилирование / Dihydroxylation	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	370,1649	-0,9	4,09
M7.3	Дигидроксилирование / Dihydroxylation	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	370,1649	-1,2	4,46
M7.4	Дигидроксилирование / Dihydroxylation	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	370,1649	-1,2	4,59
M7.5	Гидроксилирование + N-окисле- ние / Hydroxylation + N-oxidation	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	370,1649	-1,3	5,00
M7.6	Гидроксилирование + N-окисле- ние / Hydroxylation + N-oxidation	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	370,1649	-1,1	5,07
M7.7	Гидроксилирование (хину- клидин) + N-окисление / Hydroxylation (quinuclidine) + N-oxidation	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	370,1649	-0,9	5,80
M7.8	Дигидроксилирование + GA / Dihydroxylation + GA	C ₂₇ H ₃₁ NO ₁₁	546,1970	-1,3	2,95

Продолжение таблицы 2

Метаболит (вещество) / Metabolite(substance)	Метаболическая реакция / Metabolic reaction	Брутто-формула / Brutto formula	Теор. m/z / Calc. m/z	Δ m/z	RT, мин / RT, min
M7.9	Дигидроксилирование + GA / Dihydroxylation + GA	C ₂₇ H ₃₁ NO ₁₁	546,1970	-1,3	4,00
M7.10	Дигидроксилирование + GA / Dihydroxylation + GA	C ₂₇ H ₃₁ NO ₁₁	546,1970	-0,8	4,19
M7.11	Гидроксилирование + N-окисление+ GA / Hydroxylation + N-oxidation+ GA	C ₂₇ H ₃₁ NO ₁₁	546,1970	-1,4	4,30
M7.12	Дигидроксилирование + Me / Dihydroxylation + Me	C ₂₂ H ₂₅ NO ₅	384,1806	-1,1	5,03
M7.13	Дигидроксилирование + Me / Dihydroxylation + Me	C ₂₂ H ₂₅ NO ₅	384,1806	-1,5	5,15
M7.14	Дигидроксилирование + Me+ GA / Dihydroxylation + Me+ GA	C ₂₈ H ₃₃ NO ₁₁	560,2126	-1,3	4,24
M7.15	Дигидроксилирование + Me+ GA / Dihydroxylation + Me+ GA	C ₂₈ H ₃₃ NO ₁₁	560,2126	-1,4	4,41
M8.1	Тригидроксилирование / Trihydroxylation	C ₂₁ H ₂₃ NO ₆	386,1598	-1,3	3,12
M8.2	Дигидроксилирование + N-окисление / Dihydroxylation + N-oxidation	C ₂₁ H ₂₃ NO ₆	386,1598	-1,3	3,62
M8.3	Дигидроксилирование + N-окисление / Dihydroxylation + N-oxidation	C ₂₁ H ₂₃ NO ₆	386,1598	-1,1	4,59
M8.4	Дигидроксилирование + N-окисление+ GA / Dihydroxylation + N-oxidation+ GA	C ₂₇ H ₃₁ NO ₁₂	562,1919	-1,4	4,14
M8.5	Тригидроксилирование + Me / Trihydroxylation + Me	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆	400,1755	-1,4	3,82
M8.6	Дигидроксилирование + N-окисление + Me / Dihydroxylation + N-oxidation+ Me	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆	400,1755	-1,5	5,13
M8.7	Дигидроксилирование + N-окисление + Me / Dihydroxylation + N-oxidation+ Me	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆	400,1755	-1,3	5,20
M8.8	Тригидроксилирование + Me + GA / Trihydroxylation + Me + GA	C ₂₈ H ₃₃ NO ₁₂	576,2076	-1,3	3,13
M8.9	Дигидроксилирование+ N-окисление+ Me + GA / Dihydroxylation + N-oxidation + Me + GA	C ₂₈ H ₃₃ NO ₁₂	576,2076	-1,5	4,39
M9.1	Тетрагидроксилирование / Tetrahydroxylation	C ₂₁ H ₂₃ NO ₇	402,1547	-0,5	3,70
M9.2	Тетрагидроксилирование / Tetrahydroxylation	C ₂₁ H ₂₃ NO ₇	402,1547	-0,9	4,38
M9.3	Тетрагидроксилирование / Tetrahydroxylation	C ₂₁ H ₂₃ NO ₇	402,1547	-1,0	4,48
M9.4	Тригидроксилирование + N-окисление + Me / Trihydroxylation + N-oxidation+ Me	C ₂₂ H ₂₅ NO ₇	416,1704	-0,7	3,85

Примечание.

TGA – глюкуронидирование; Me – метилирование; RT – время удерживания.
 Представлены данные авторов.

Note.

GA, glucuronidation; Me, methylation; RT, retention time.
 Authors' data.

Коваленко И.И., Ярлыченко А.С., Ставитская Я.В., Колосова Н.А., Рыбальченко И.В., Григорьев А.М.
Kovalenko I.I., Iarlychenko A.C., Stavitskaya Y.V., Kolosova N.A., Rybalchenko I.V., Grigoryev A.M.

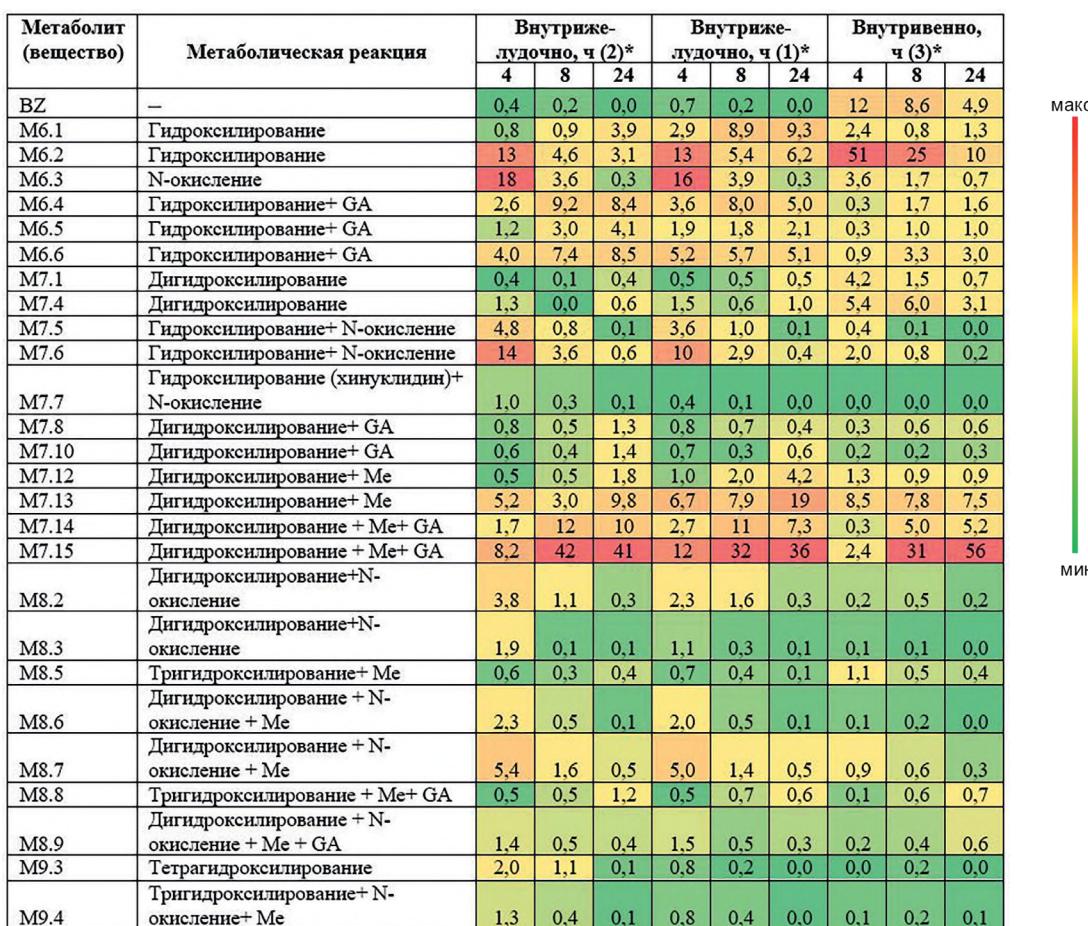


Рисунок 3 – Площади пиков метаболитов BZ в моче крыс (внутренняя нормировка, %). *Нумерация крыс приведена в скобках. GA - глукuronидирование; Me - метилирование (данные авторов)
Figure 3: The peak areas of BZ metabolites in rat urine (internal normalization, %). * Rat numbering is given in parentheses. GA, glucuronidation; Me, methylation (authors' data)

тонированным 3-Q, а m/z 110 – продуктом его дегидратации. Несколько необычным выглядит образование ион-радикала с m/z 111, возможно, связанное с изначальным протонированием атома азота. Эти ионы и продукты их метаболических модификаций в дальнейшем применялись для структурной идентификации метаболитов.

Ранее сообщалось, что лишь небольшая доля BZ экскретируется с мочой в неизмененном состоянии (около 3% исходной дозы) [21]. Относительное содержание BZ в моче после внутрижелудочного введения мало (относительные площади его пиков менее 1%, рисунок 3), но становится заметным при внутривенном введении (около 14% для 4 ч). Этот факт объясняется различием путей выведения BZ: при внутрижелудочном экспонировании исходное вещество подвержено окислительному метabolизму в печени, куда после абсорбции оно транспортируется кровотоком через воротную вену.

Молекула BZ имеет третичную гидроксильную группу и, следовательно, может образовывать метаболиты фазы II. Фрагментация обнаруженного глюкуронида BZ (M1.1, рисунок 4Б) подобна фрагментации исходного соединения. В начале этого процесса происходит элиминирование остатка глюкуроновой кислоты и получающийся масс-спектр почти не содержит ее фрагментов, поэтому на рисунке 4 и далее наличие остатка глюкуроновой кислоты указано только в обозначениях метаболитов. BZ глюкуронидирован в средней степени (около 30%, таблица 3) и только при условии внутрижелудочного введения по тем же причинам, что и для относительного содержания неизмененного BZ в моче.

BZ – сложный эфир, и простейшим вариантом его метаболизма является гидролиз, причем этот процесс может проходить уже в крови ввиду активности кровяных эстераз. Содержание получающихся 3-Q (M2.1) и

**Структурная идентификация и сравнительная оценка содержания метаболитов инкапаситанта BZ в моче...
Structural identification and comparative assessment of the content of BZ incapacitant metabolite in rat urine...**

HDPA (M4.1) не рассматривали ввиду кардинальных отличий способов определения: 3-Q почти не удерживается в гидрофобном ЖХ-режиме, а для регистрации HDPA и ее производных необходима отрицательная ионизация. Тем не менее, можно отметить, что площади пиков 3-Q были доминирующими для всех мочевых образцов, а пиков HDPA (равно как и ее производных) – наоборот, очень малыми. Оба соединения мало пригодны для диагностики отравления BZ в том числе из-за малой характеристичности, хотя обнаружение 3-Q (хорошо заметного компонента) должно быть причиной дополнительных исследований.

Выше было отмечено, что гидроксилирование проходит преимущественно по алифатическим, а не ароматическим остаткам исходного соединения. Однако – несмотря на предельный характер остатка 3-Q – мы не обнаружили его гидроксилированных метаболитов. При разделении образцов мочи в гидрофильном режиме (HILIC) обнаружили только одно соединение (M3.1, рисунок 4B), масса которого соответствует добавке одного атома кислорода к 3-Q. Оно предположительно идентифицировано как N-оксид ввиду легкого элиминирования радикала гидроксила (рисунок 4Г) от протонированной молекулы с образованием катион-радикала с

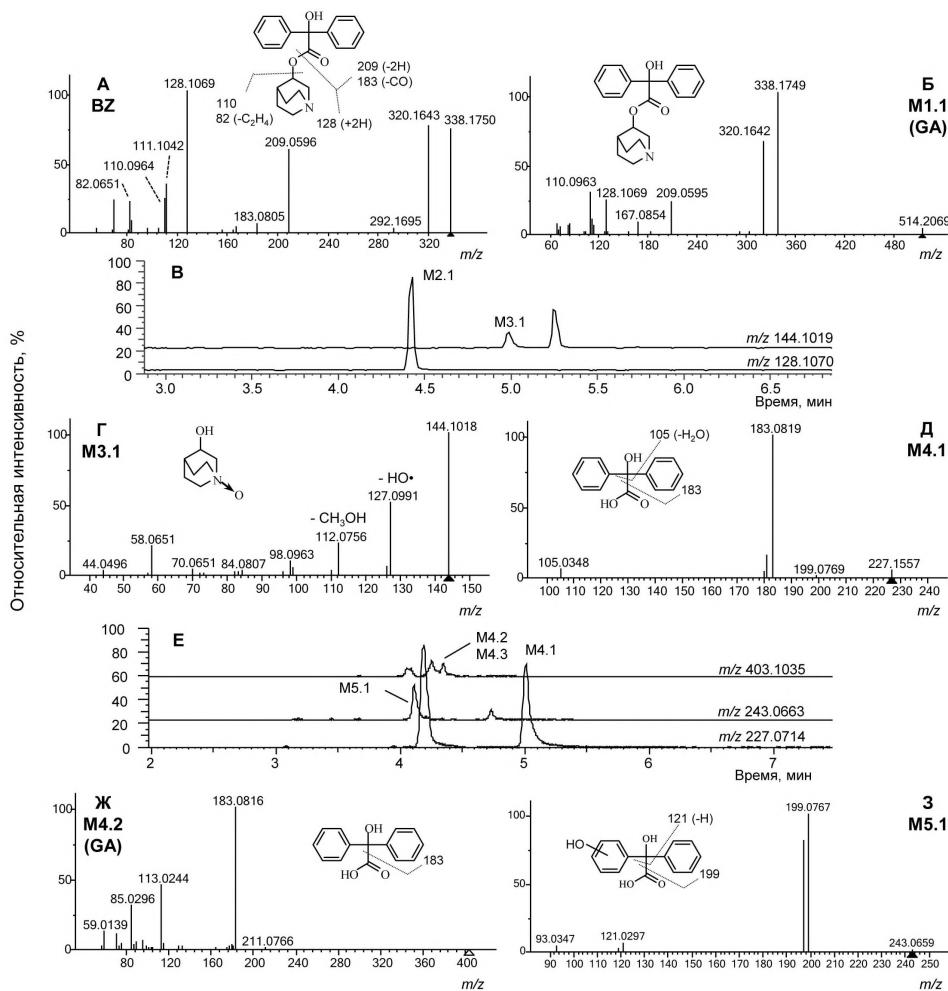


Рисунок 4 – ЖХ-МСВР (ЭРИ) масс-спектры BZ (A), глюкуронида BZ (метаболит M1.1) (Б), 3-хинуклидинол-N-оксида (M3.1) (Г), HDPA (M4.1, отрицательная ионизация) (Д), глюкуронида HDPA (M4.2, отрицательная ионизация) (Ж), гидроксилированной HDPA (M5.1, отрицательная ионизация) (З). Хроматограммы ЖХ-МСВР мочи крыс с 3-хинуклидинолом и его N-оксидом (HILIC) (Б) и метаболитами – производными HDPA (отрицательная ионизация) (Е) (данные авторов)

Figure 4: LC-HRMS(ESI) mass spectra of BZ (A), BZ glucuronide (metabolite M1.1) (Б), 3-quinuclidinol-N-oxide (M3.1) (Г), HDPA (M4.1, negative ionization) (Д), HDPA glucuronide (M4.2, negative ionization) (Ж), hydroxylated HDPA (M5.1, negative ionization) (З). LC-HRMS chromatograms of rat urine with 3-quinuclidinol and its N-oxide (HILIC) (Б) and HDPA-derived metabolites (negative ionization) (Е) (authors' data)

m/z 127. Как отмечено выше, образование ион-радикалов нехарактерно для фрагментации ионов с изначальным отсутствием неспаренных электронов, и в данном случае объясняется двумя факторами: слабой связью между азотом и кислородом и протонируемостью атома кислорода в N-оксиде. Соединение, элюирующееся после метаболита M3.1 на хроматограмме *m/z* 144, является биогенным, и в его масс-спектре присутствуют ионы, характерные для M3.1.

Фрагментация HDPAА (M4.1, отрицательная ионизация) проста и сводится к отщеплению молекулы CO₂ (ион с *m/z* 183) и дальнейшему образованию иона с *m/z* 105, характерному для гидроксилированных фенилсодержащих соединений, и стабильного, скорее всего, благодаря формированию

ароматического семичленного цикла (ион тропилия). HDPAА глюкуронидирована в средней степени (около 40–50%), причем – как и для 3-Q – степень глюкуронидирования снижается при внутривенном введении BZ, таблица 3. Основной ион в масс-спектре глюкуронидов HDPAА (M4.2 и M4.3) с *m/z* 183 соответствует декарбоксилированной HDPAА, остальные ионы образованы фрагментацией глюкуроновой кислоты. Пути фрагментации гидроксилированной HDPAА (M5.1, рисунок 43) подобны исходному соединению.

Моногидроксилирование и N-окисление. Судя по относительным площадям пиков, моногидроксилирование и N-окисление – одно из основных направлений мочевого метabolизма BZ, причем вклады обоих процессов сопоставимы. Два пика (M6.1 и

Таблица 3 – Медианные значения степеней глюкуронидирования и метилирования (%) BZ и его метаболитов

Table 3. Median values of the degrees of glucuronidation and methylation (%) of BZ and its metabolites

Вид фазы I (вещество) / Type of phase I (substance)	Вид фазы II / Type of phase II	Способ экспонирования (номер крысы) / Administration method (rat number)			Продукты / Products
		B/жел. (1) / I/gast. (1)	B/жел. (2) / I/gast. (2)	B/вен. (3) / I/ven. (3)	
- (BZ)	Глюкуронидирование / Glucuronidation	26	27	0	M1.1
Гидролиз (HDPAА) / Hydrolysis (HDPAА)	Глюкуронидирование / Glucuronidation	48	38	22	M4.2, M4.3
Моногидроксилирование / Monohydroxylation	Глюкуронидирование / Glucuronidation	75	44	19	M6.4-M6.8
N-окисление / N-oxidation	Глюкуронидирование (трет-OH) / Glucuronidation (tert-OH)	1	1	0	M6.9, M6.10
Дигидроксилирование/ Dihydroxylation	Глюкуронидирование / Glucuronidation	73	42	11	M7.8-M7.10
Моногидроксилирование + N-окисление / Monohydroxylation + N-oxidation	Глюкуронидирование / Glucuronidation	4	6	4	M7.11
Дигидроксилирование / Dihydroxylation	Метилирование / Methylation	90	89	52	M7.12, M7.13
Дигидроксилирование / Dihydroxylation	Глюкуронидирование + метилирование / Glucuronidation + methylation	81	65	80	M7.14, M7.15
Тригидроксилирование / Trihydroxylation	Метилирование / Methylation	97	93	80	M8.5
Дигидроксилирование + N-окисление / Dihydroxylation + N-oxidation	Глюкуронидирование / Glucuronidation	34	22	31	M8.4
Дигидроксилирование + N-окисление / Dihydroxylation + N-oxidation	Метилирование / Methylation	84	86	91	M8.6, M8.7
Дигидроксилирование + N-окисление / Dihydroxylation + N-oxidation	Глюкуронидирование + метилирование / Glucuronidation + methylation	62	61	50	M8.8

**Структурная идентификация и сравнительная оценка содержания метаболитов инкапаситанта BZ в моче...
Structural identification and comparative assessment of the content of BZ incapacitant metabolite in rat urine...**

Продолжение таблицы 3

Вид фазы I (вещество) / Type of phase I (substance)	Вид фазы II / Type of phase II	Способ экспонирования (номер крысы) / Administration method (rat number)			Продукты / Products
		В/жел. (1) / I/gast. (1)	В/жел. (2) / I/gast. (2)	В/вен. (3) / I/ven. (3)	
Дигидроксилирование + N-окисление / Dihydroxylation + N-oxidation	Глюкуронидирование + метилирование / Glucuronidation + methylation	20	20	35	M8.9

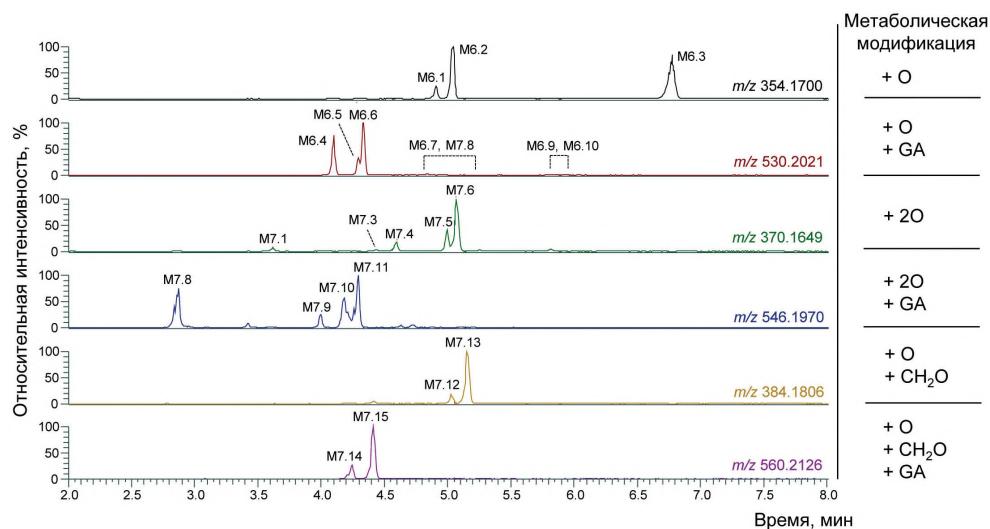
Примечание.
В/жел. – внутрижелудочно; В/вен. – внутривенно.
Данные авторов.
Note.
I/gast, intragastric; I/ven, intravenous.
Authors' data.

М6.2) около времени удерживания 5 мин (рисунок 5) принадлежат изомерам, гидроксилированным по фенильному остатку. Об этом свидетельствует наличие интенсивного иона с *m/z* 128 (неизмененный 3-Q) и группа ионов с *m/z* 225, 209 и 181, образующихся при фрагментации гидроксилированного остатка гидроксидифенилоксоэтана, рисунок 6А. Метаболиты М6.1 и М6.2 глюкуронидированы в средней и в высокой степени, причем степень глюкуронидирования при внутривенном введении снижается более, чем в два раза. Масс-спектры глюкуронидов (рисунок 6В) содержат интенсивные пики ионов с *m/z* 354, образующихся при элиминировании глюкуроновой кислоты, а основные пути фрагментации подобны свободным метаболитам.

Метаболит М6.3 идентифицировали как N-оксид BZ, и его фрагментация несколько необычна. Ион с *m/z* 183 соответствует остатку дифенилметанола (как и для неизме-

ненного BZ), а ион с *m/z* 144 – остатку 3-Q с дополнительным атомом кислорода. Согласно проведенному MC³, окисленный остаток 3-Q дегидратируется (*m/z* 126) и элиминирует атом кислорода от N-оксида (*m/z* 110). Кроме того, в масс-спектре MC³ иона *m/z* 144 присутствует продукт отщепления радикала гидроксила (ион с *m/z* 127), что позволяет сделать уверенный вывод об идентичности структуры иона с *m/z* 144 и N-оксидированного 3-Q (метаболита М3.1).

Ион-радикал с *m/z* 243 (C₁₅H₁₇O₂N⁺) образуется при формальном последовательном элиминировании фенола и радикала гидроксила от протонированной молекулы. Этот несколько необычный процесс обусловлен, скорее всего, слабой связью N-O и протонированностью N-оксида. Последнее подтверждено ростом удерживания метаболита М6.3 при увеличении pH фазы А. В масс-спектре MC³ иона с *m/z* 243 присутствуют



**Рисунок 5 – Хроматограммы ЖХ-МСВР мочи с метаболитами групп M6 и M7 (данные авторов)
Figure 5: LC-HRMS chromatogram of urine with group M6 and M7 metabolites (authors' data)**

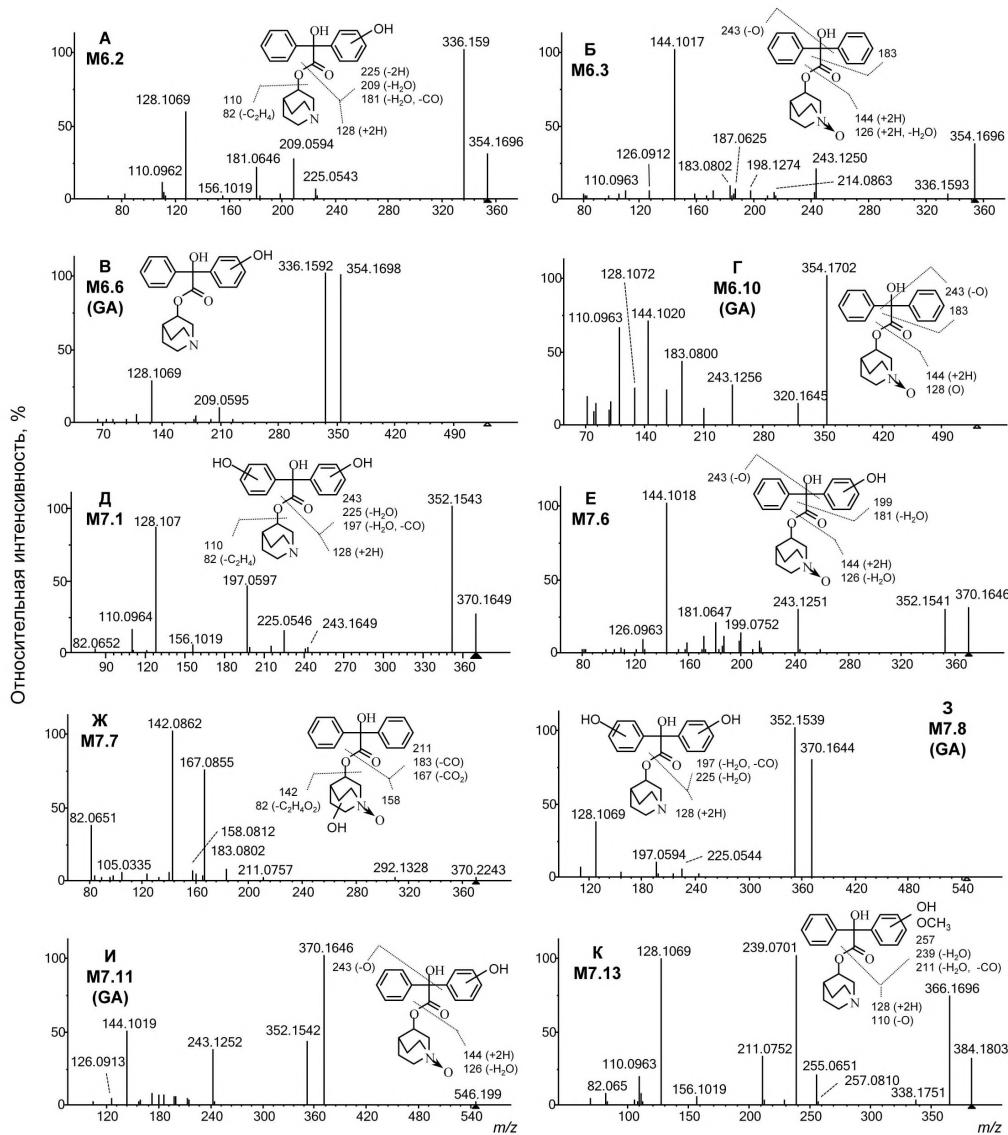


Рисунок 6 – ЖХ-МСВР (ЭРИ) масс-спектры метаболитов групп M6 и M7 (данные авторов)
Figure 6: LC-HRMS (ESI) mass spectra of group M6 and M7 metabolites (authors' data)

фрагментные ионы, образованные элиминированием радикалов с m/z 214 ($C_{13}H_{12}O_2N^+$, отщепление этила) и 198 ($C_{14}H_{16}N^+$, выброс CO_2 и протона), а также нейтрального бутена (m/z 187, $C_{11}H_9O_2N^+$). Эти процессы и существование ионов с m/z 143 ($C_{10}H_9N^+$) и m/z 130 ($C_9H_8N^+$) в масс-спектре иона m/z 243 свидетельствуют о перегруппировке. Выброс CO_2 отмечали также при ЭИ (см. далее).

Сделанные выводы полностью согласуются с результатами работы [22]. В отличие от метаболитов, гидроксилированных по фенильному остатку, M6.3 почти не глюкуронидирован. Два его глюкуронида (M6.9 и M6.10), обнаруженных в следовых концентрациях,

имеют значительное удерживание и образованы глюкуронидированием третичной гидроксильной группы. Интересно отметить, что в их масс-спектрах присутствуют ионы с m/z 144 и 128, соответствующие окисленному и неизмененному остаткам 3-Q (рисунок 6Г). Это обусловлено легкостью элиминирования атома кислорода при гетеролитическом разрыве связи N-O и подтверждается наличием в масс-спектре M6.10 подобной пары ионов (m/z 354 и 320), имеющих разницу в один атом кислорода и молекулы воды.

Хроматографическое удерживание N-оксида больше, чем у метаболитов, гидроксилированных по фенильному остатку

Структурная идентификация и сравнительная оценка содержания метаболитов инкапаситанта BZ в моче... Structural identification and comparative assessment of the content of BZ incapacitant metabolite in rat urine...

(M6.3>M6.1, M6.2) ввиду делокализации гидрофильных участков по всей структуре для последних: гидроксильная группа – на фенильном остатке и протонированный атом азота – в 3-Q. Это правило соблюдается и для полигидроксилированных метаболитов.

Относительное содержание фенилгидроксилированного M6.2 и N-оксида M6.3 сопоставимо при внутрижелудочном введении и малых временах отбора мочи (4 и 8 ч); однако, при внутривенном введении всегда преобладал M6.2. Согласно нашему опыту, метаболиты M6.1–M6.3 и их глюкурониды представляют наибольший интерес ввиду высокой вероятности обнаружения их в метаболическом профиле человека.

Метилированные моногидроксилированные метаболиты не обнаружили.

Дигидроксилирование, N-окисление и дополнительное метилирование. Пути фрагментации метаболитов этой группы в целом подобны предыдущей. Метаболиты, дигидроксилированные по фенильным остаткам весьма многочисленны как ввиду изомерии положения, так и возможной диастереомерии. В этом и в следующих разделах будут рассмотрены только наиболее интенсивные и структурно-разнообразные формы.

Как было отмечено выше, метаболиты гидроксилированные по фенильным остаткам (M7.1–M7.4), удерживаются слабее N-оксидов M7.5 и M7.6. Их относительное содержание невелико. В масс-спектрах M7.1–M7.4 присутствуют как интенсивные пики ионов с m/z 128 (неизмененный остаток 3-Q), так и группа пиков ионов, характеризующих остаток тригидроксидифенилоксоэтана (m/z 243, 225, 215 и 197), рисунок 6Д. Ион, соответствующий самому остатку (m/z 243), малоинтенсивен, но при его дегидратации (m/z 225) и последующем элиминировании CO (m/z 197) образуются более интенсивные ионы, устойчивость которых определяется образованием дополнительных кратных связей и сопряжением в дифенильной системе. Метаболиты, дигидроксилированные по фенильным остаткам, глюкуронидированы в средней и высокой степени (около 42–73%) только для внутрижелудочного введения, в то время как для внутривенного введения степень глюкуронидирования невысока (около 11). Фрагментация глюкуронидов M7.8–M7.10 подобна метаболитам фазы I.

Содержание метаболита M7.6 (моногидроксилирование фенильного остатка и N-окисление) велико и подобно содержанию моногидроксилированных метаболитов. В его масс-спектре присутствует интенсивный пик иона, соответствующего N-окисленному

остатку 3-Q (m/z 144) и пик ион-радикала с m/z 243, рассмотренного выше с продуктами распада. N-Окисленные метаболиты с дополнительной гидроксильной группой на фенильном остатке (M7.5 и M7.6) почти не глюкуронидированы.

Метаболит M7.7 малоинтенсивен и заметен только после внутрижелудочного введения BZ. Однако его структура представляет интерес из-за наличия двух приобретенных атомов кислорода на остатке 3-Q. Данный вывод основан на существовании иона с m/z 158 ($C_7H_{12}O_3N^+$) и продукта элиминирования атома кислорода от него (m/z 142, $C_7H_{12}O_2N^+$). Ион с m/z 82 ($C_5H_8N^+$) образован разрушением части хинуклидинольного бицикла с отщеплением $C_2H_4O_2$. Можно уверенно предположить, в структуре M7.6 один атом кислорода принадлежит N-оксиду, а второй – гидроксильной группе на остатке 3-Q, и сделать вывод о возможности гидроксилирования хинуклидинового остатка по крайней мере, после N-окисления. Глюкуронид метаболита M7.7 не обнаружили.

В отличие от метаболитов – продуктов однократного окисления, рассмотренных в предыдущем разделе, двукратно окисленные метаболиты подвержены интенсивному метилированию (образование M7.12 и M7.13, до 90%), а метилированные продукты – интенсивному глюкуронидированию (>65%). В данном случае интересно отметить, что преимущественно метилируются метаболиты, дигидроксилированные по фенильным кольцам. Метаболиты, моногидроксилированные фенильному кольцу и впоследствии метилированные, также были обнаружены, но не включены в описание из-за очень малой интенсивности.

В масс-спектре наиболее интенсивного метаболита M7.13 присутствует интенсивный пик иона с m/z 128 (неизмененный остаток 3-Q) и ряд пиков, характеризующих дигидроксилированный метилированный гидроксидифенилоксоэтановый остаток (m/z 211, 239, 257). Их массы отличаются от такого же набора для дигидроксилированного M7.1 на метиленовую группу. Все эти ионы также представлены в масс-спектре глюкуронида M7.15 (рисунок 7А), что позволяет сделать вывод о сходстве структур M7.13 и агликона метаболита M7.15 без учета положения гидроксильных групп в пределах фенильных остатков. Метаболит M7.15, в котором одна гидроксильная группа метилирована, а другая глюкуронидирована, доминирует в большинстве образцов мочи (исключая самые ранние, т.е. собранные в течение 4 часов после экспонирования). Содержание M7.15 и его минор-

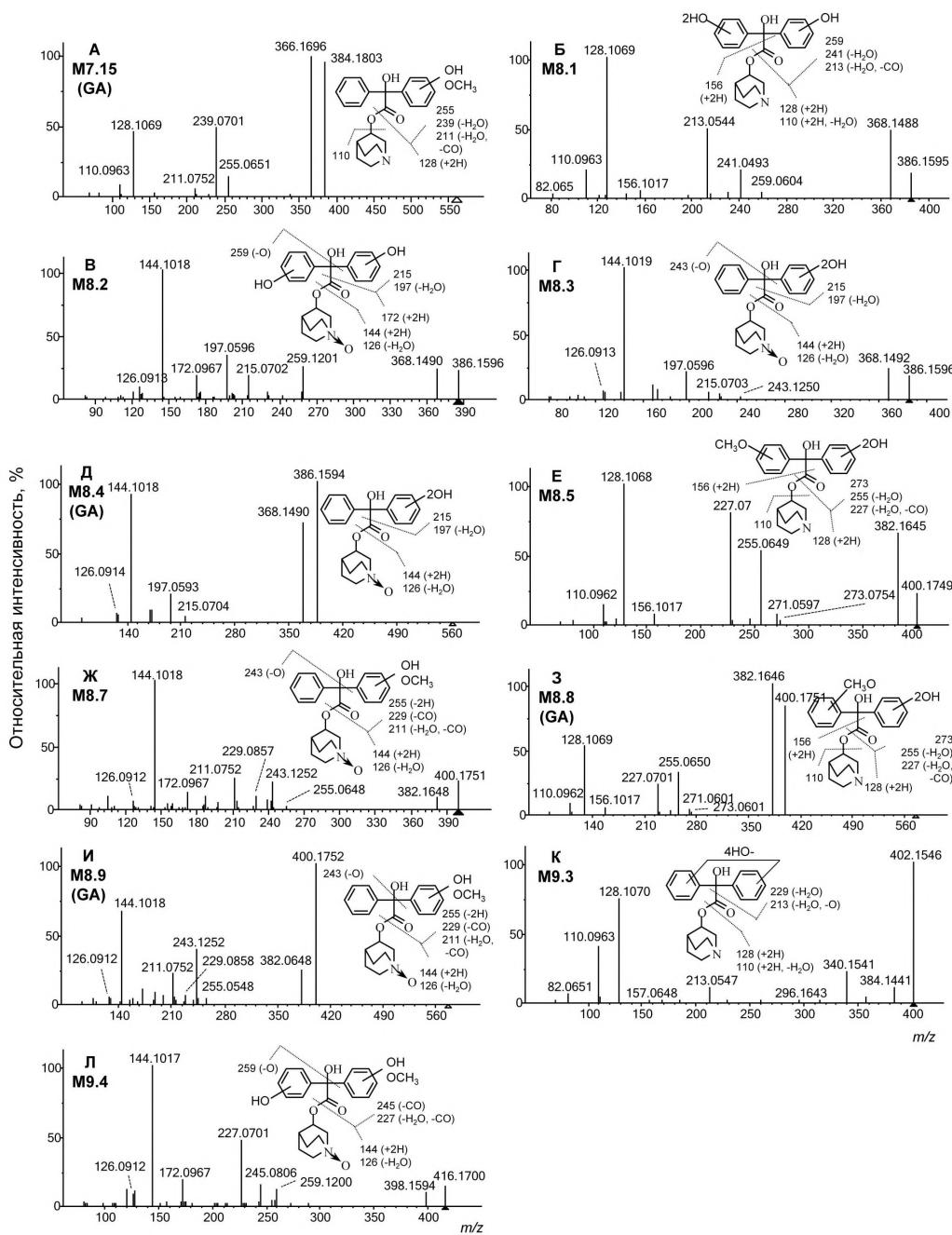


Рисунок 7 – ЖХ-МСВР (ЭРИ) масс-спектры метаболитов групп M7–M9 (данные авторов)
Figure 7: LC-HRMS (ESI) mass spectra of group M7–M9 metabolites (authors' data)

ного изомера M7.14 (как абсолютное, так и относительное) растет со временем, прошедшим с момента экспонирования. В меньшей степени такое поведение характерно и для свободных форм (M7.12, M7.13).

Тригидроксилирование, N-окисление и дополнительное метилирование. Содержание метаболита M8.1, имеющего три гидроксильные группы на фенильных остатках (рисунок 7Б), весьма мало, и это подтверждает тезис о меньшей вероятности повторного

гидроксилирования одного остатка. Содержание метаболитов-N-оксидов M8.2 и M8.3, в структурах которых две гидроксильные группы находятся на фенильных остатках, значительно выше. В данном случае можно точно сказать, что у метаболита M8.3 обе гидроксильные группы расположены на одном фенильном остатке ввиду наличия иона с m/z 243 в масс-спектре, а у M8.2 – на разных, так как масса подобного фрагмента увеличена на массу атома кислорода (m/z 259),

**Структурная идентификация и сравнительная оценка содержания метаболитов инкапаситанта BZ в моче...
Structural identification and comparative assessment of the content of BZ incapacitant metabolite in rat urine...**

рисунки 7В и 7Г. Глюкурониды метаболитов M8.1 и M8.2 малоинтенсивны, а приведенный на рисунке 7Д масс-спектр (M8.4) возможно, следует отнести к глюкурониду метаболита M8.3 ввиду соответствия времени удерживания (меньше, чем у свободной формы) и сходства фрагментации. Степень глюкуронидирования умеренная (<34%). Хроматограммы мочи с этими метаболитами изображены на рисунке 8.

Перечисленные метаболиты представлены и в метилированных формах, причем степени метилирования высоки (>80%). Масс-спектр метилированного производного для метаболита с тремя гидроксильными группами на фенильных кольцах (M8.5) представлен на рисунке 7Е. Основные пути его фрагментации подобны путям для возможной свободной формы (M8.1). Масс-спектр M8.5 не позволяет установить расположение приобретенных функциональных групп, и существование метоксигруппы на одном из фенильных колец при дигидроксилировании другого является только предположением, основанном на возможных стерических затруднениях при метилировании. Относительное содержание M8.5 невелико, а степень глюкуронидирования подобных структур (тригидроксилированных по фенильным кольцам и метилированных) средняя (около 50–60%). Масс-спектр глюкуронидированной метилированной формы (метаболит M8.8, рисунок 7З) весьма подобен масс-спектру метилированной формы с поправкой на остаток глюкуроновой кислоты.

Содержание другого метилированного метаболита (M8.7, N-оксид) гораздо выше, чем M8.5. Согласно масс-спектру M8.7

(рисунок 7Ж) и наличию иона с m/z 243, в его структуре гидроксильная и метокси-группа расположены на одном фенильном кольце. Как и для M8.1, степень метилирования высока, а степень последующего глюкуронидирования наоборот, умеренная (<35%, метаболит M8.9).

Тетрагидроксилирование, N-окисление и дополнительное метилирование. Четырехкратно окисленные метаболиты BZ (M9.1–M9.3) – группа, представляющая наименьший интерес в практическом плане из-за малого содержания и наибольших отличий от исходного соединения. Поэтому далее описаны только наиболее интенсивные представители этой группы. У метаболитов M9.1–M9.3 все четыре гидроксильные группы расположены на фенильных кольцах, и остаток 3-Q неизменен (в масс-спектре пики ионов с m/z 128 и 110, рисунок 7К). Эта структура подтверждается наличием иона с m/z 229 ($C_{13}H_9O^+$); более интенсивный ион с m/z 213, брутто-формула которого соответствует формальному элиминированию атома кислорода от m/z 229, по-видимому, относится к другому пути фрагментации. Ионы с m/z 358 и 340 свидетельствуют о выбросе CO_2 (во втором случае – с дегидратацией), что уже отмечено выше для распада иона с m/z 243. В данном случае выброс CO_2 происходит из протонированной молекулы.

Необычным также выглядит отсутствие N-окисленных структур среди метаболитов с четырьмя приобретенными атомами кислорода; возможно, N-окисление характерно только для достаточно гидрофобных соединений. Глюкурониды тетрагидроксилированных метаболитов не обнаружили, что

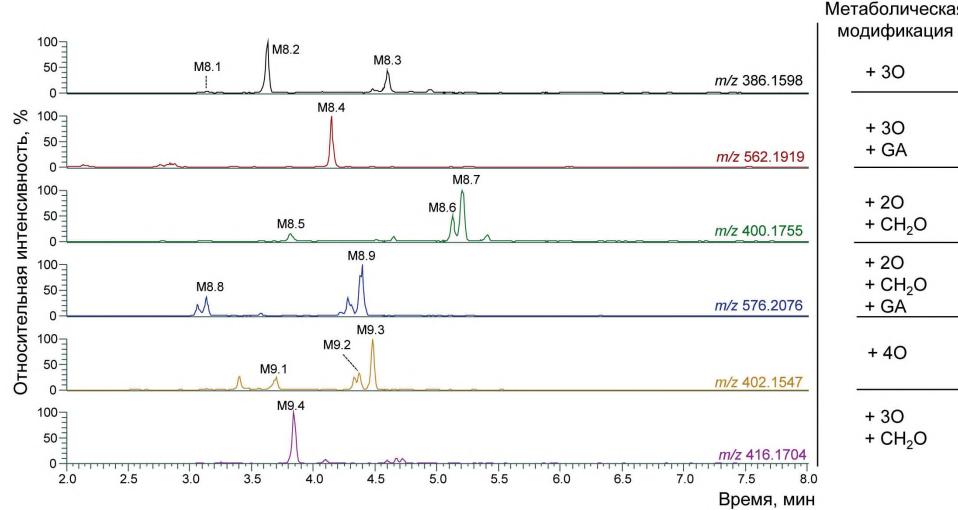


Рисунок 8 – Хроматограммы ЖХ-МСВР мочи с метаболитами групп M8 и M9 (данные авторов)
Figure 8: LC-HRMS chromatogram of urine with group M8 and M9 metabolites (authors' data)

выглядит реалистичным при учете значительной гидрофильности этих структур.

Среди продуктов метилирования четырехкратно окисленных метаболитов преобладает N-оксид (M9.4, *рисунок 7Л*), и его фрагментация мало отличается от других метилированных метаболитов. Содержание M9.4 сопоставимо со свободной четырехкратно окисленной формой M9.3.

Неизмененный BZ и его метаболиты в плазме крови. При анализе крови для достоверного определения причин интоксикации желательно обнаружение неизмененного токсиканта. Разумеется, хроматографический пик BZ имел наибольшую площадь в пробе, отобранный через наименьшее время после экспонирования (0,5 ч, крыса № 4). В этой пробе относительное содержание метаболитов было невысоким, *рисунок 9* (указаны только метаболиты с относительной площадью пиков более 1%). В остальных пробах плазмы крови, отобранных через 24 ч, неизмененный BZ содержался в следовых концентрациях (в 400–1000 раз меньше), и для его определения необходимы высокочувствительные методы с регистрацией масс-спектров MC².

Во всех пробах, отобранных через сутки, доминирует метаболит M7.14, являющийся продуктом дигидроксилирования и последующих метилирования и глюкуронидирования. Это соединение можно считать предпочтительным для диагностики по анализу крови, если после интоксикации прошло значительное время. Однако – при учете возможной разницы в метabolизме человека и крыс – обращать внимание на наличие неизмененного BZ. Метаболиты M6.4 и M6.5

(моногидроксилированные глюкуронидированные формы) также могут быть полезны для диагностики при учете высокой вероятности их присутствия в крови человека.

ГХ-МС, BZ и его метаболиты в моче.

Анализ мочи методом ГХ-МС требует дополнительной подготовки проб, включающей перевод компонентов в органический растворитель и, возможно, дериватизации. Третичная гидроксильная группа BZ может быть дериватизирована, но целесообразность этой процедуры невысока: в условиях ГХ-МС BZ элюируется узким пиком, а выход деривата (в нашем случае это триметилсилирование в присутствии BSTFA) недостаточен. Такое поведение BZ и его метаболитов определяется малой стерической доступностью третичного гидроксила.

Точное сопоставление изомерных метаболитов, детектируемых в условиях ЖХ-МС и ГХ-МС обычно затруднительно, но и не является необходимым. Поэтому метаболитам, детектируемым при ГХ-МС, были присвоены самостоятельные наименования. Масс-спектры (ЭИ) метаболитов BZ и дериватов приведены на *рисунках 10 и 11*; на втором из них также изображены ГХ-МС хроматограммы проб мочи.

Пробы готовили двумя способами, основанными на жидкостно-жидкостной (ЖЖЭ) и твердофазной экстракции (ТФЭ). Степень экстрагирования оценивали методом ЖХ-МСВР по остаточному содержанию метаболитов в водной фазе. При ЖЖЭ она была более 84% для BZ,mono- и дигидроксилированных метаболитов с расположением гидроксилов на фенильных кольцах (M6.1, M6.2, M7.1) и продуктов метилирования (M7.12,

Метаболит (вещество)	Метаболическая реакция	Внутрижелудочно		Внутривенно	
		24ч (3)	0,5 ч (4)	24 ч (1)	24 ч (2)
BZ	–	10	96	4,3	0,9
M6.2	Гидроксилирование	0,6	1,1	0,9	0,7
M6.3	N-окисление	0,6	0,5	3,3	0,3
M6.4	Гидроксилирование+ GA	2,5	0,1	11	10
M6.6	Гидроксилирование+ GA	3,4	0,4	11	7,9
M7.8	Дигидроксилирование+ GA	0,0	0,1	0,6	3,8
M7.9	Дигидроксилирование+ GA	0,0	0,0	0,6	1,8
M7.11	Гидроксилирование + N-окисление+ GA	0,0	0,0	1,5	1,8
M7.12	Дигидроксилирование + Me	2,3	0,1	1,2	1,2
M7.13	Дигидроксилирование + Me	3,2	0,5	2,5	1,4
M7.14	Дигидроксилирование + Me + GA	7,3	0,1	4,4	8,1
M7.15	Дигидроксилирование + Me + GA	69	1,0	56	58
M8.8	Тривидроксилирование + Me + GA	0,7	0,1	0,7	2,9

Рисунок 9 – Площади пиков метаболитов BZ в плазме крови крыс (внутренняя нормировка, %). Нумерация крыс приведена в скобках. GA – глюкуронидирование; Me – метилирование (данные авторов)

Figure 9: The peak areas of BZ metabolites in rat plasma (internal normalization, %). Rat numbering is shown in parentheses GA, glucuronidation; Me, methylation (authors' data)

Структурная идентификация и сравнительная оценка содержания метаболитов инкапаситанта BZ в моче...
Structural identification and comparative assessment of the content of BZ incapacitant metabolite in rat urine...

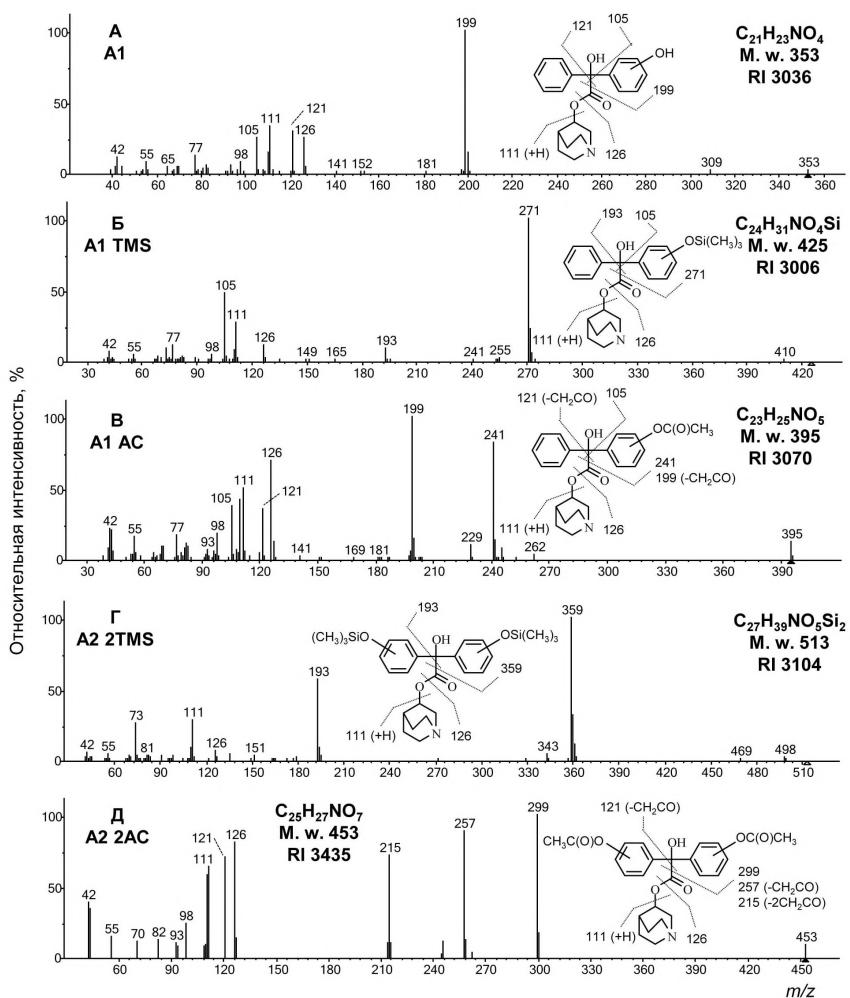


Рисунок 10 – ГХ-МС (ЭИ) масс-спектры метаболитов BZ и их дериватов (TMS – trimethylsilyлирование, AC – ацетилирование) (данные авторов)

Figure 10: GC-MS (EI) mass spectra of BZ metabolites and their derivatives (TMS, trimethylsilylation, AC, acetylation) (authors' data)

M7.13). N-окисленные метаболиты (интенсивные M6.3, M7.5, M7.6) экстрагировались значительно хуже (<25%). При ТФЭ получили качественно подобный результат при степени экстрагирования больше 63% для гидроксилированных метаболитов и больше 45% для метилатов; N-окисленные метаболиты экстрагировались так же плохо (около 14%). Эти метаболиты не элюировались в условиях ГХ по причине малой температурной стабильности.

Идентификация всех описанных ниже соединений была подтверждена регистрацией точных масс трех ионов масс-спектра; при выборе ионов предпочтение отдавали молекулярным ионам, а при их отсутствии –

наиболее тяжелым, характеристичным и интенсивным. ГХ-МС характеристики метаболитов и их дериватов приведены в таблице 4. Следует отметить некоторую разницу в виде масс-спектров (ЭИ), получаемых на моноквадрупольных инструментах и орбитальных ионных ловушках: для последних относительная интенсивность тяжелых ионов несколько ниже, и поэтому малоинтенсивные молекулярные ионы могут отсутствовать. В целом для всех рассмотренных далее соединений молекулярные ионы малоинтенсивны, либо отсутствуют.

Масс-спектр BZ (ЭИ) приведен в библиотеках mainlib (NIST)⁸ и ocad_ms_2025, а фрагментация метаболитов проходит, в целом, по

⁸ NIST/EPA/NIH 20 Mass Spectral Library. National Institute of Standards and Technology Mass Spectrometry Data Center, Gaithersburg, USA. URL: <https://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:start> (дата обращения: 12.08.2025).

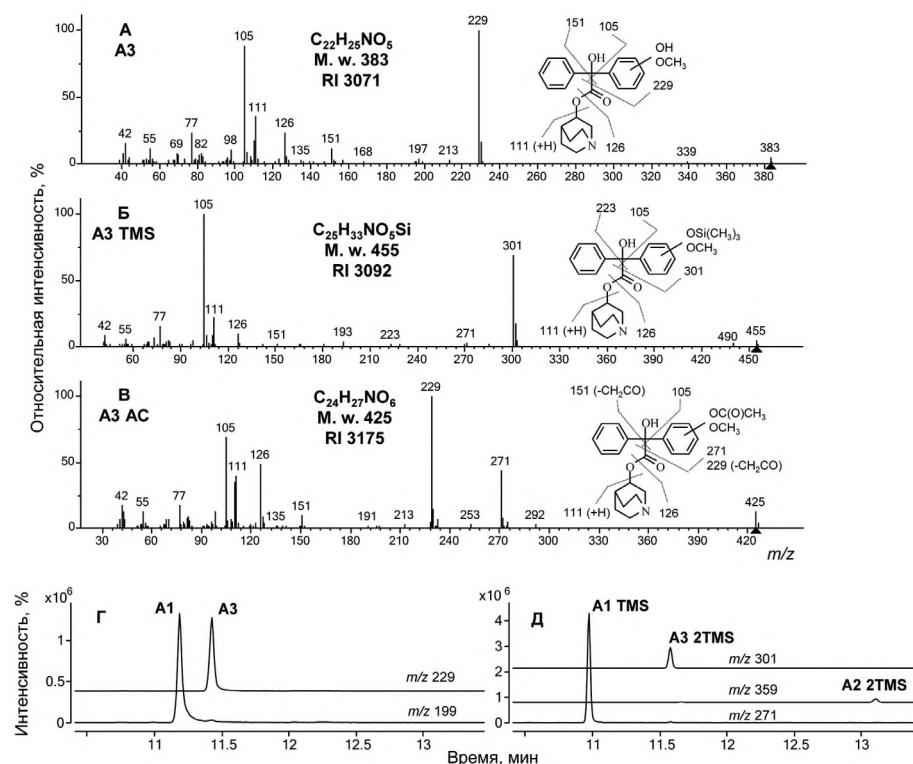


Рисунок 11 – ГХ-МС (ЭИ) масс-спектры метаболитов BZ и их дериватов (TMS-триметилсилирование, AC – ацетилирование) (А-В). Масс-хроматограммы (ГХ-МС, ЭИ) мочи с метаболитами BZ (Г, Д) (данные авторов)
Figure 11: GC-MS (EI) mass spectra of BZ metabolites and their derivatives (TMS, trimethylsilylation, AC, acetylation) (A-B). Mass-chromatograms (GC-MS, EI) of urine with BZ metabolites (Г, Д) (authors' data)

тем же путем. В масс-спектрах всех идентифицированных соединений присутствует ион с m/z 126 ($C_7H_{12}NO^+$), соответствующий остатку 3-Q, и ион-радикал с m/z 111 ($C_7H_{13}N^+$), образующийся при миграции протона третичной гидроксильной группы к остатку хинуклидинола. Такой путь образования ион-радикала с m/z 111 подтверждается его отсутствием в масс-спектрах тематических соединений с

дериватизированным третичным гидроксилом. Ввиду того, что такой же ион образуется и при ЭРИ (ЖХ-МС), хотя в этом случае он малоинтенсивен, можно сделать вывод об общей стабильности ион-радикала хинуклидина.

Разрыв связи между карбонильной группой и остатком дифенилметанола ведет к образованию интенсивных ионов, масса

Таблица 4 – ГХ-МС характеристики метаболитов BZ и их дериватов.

Параметры удерживания даны для первой (моноквадрупольной) ГХ-МС системы

Table 4. GC-MS characteristics of BZ metabolites and their derivatives. Retention parameters are given for the first GC-MS system (single quadrupole)

Метаболит / Metabolite	Брутто-формула молекулы / Molecular brutto formula	Брутто-формула иона / Ionic brutto formula	Теор. m/z / Calc. m/z	Отклонение, $\Delta m/z$ / Mass shift, $\Delta m/z$	Удерживание / Retention	
					Время, мин / Time, min	Индекс / Index
A1	$C_{21}H_{23}NO_4$	$C_{20}H_{23}NO_2$	309,1723	0,01	11,19	3036
		$C_{13}H_{11}O_2$	199,0754	0,19		
		$C_7H_{12}N_O$	126,0913	0,17		
A1 TMS	$C_{24}H_{31}NO_4Si$	$C_{23}H_{28}NO_4Si$	410,1782	0,03	10,97	3006
		$C_{16}H_{19}O_2Si$	271,1149	-0,73		
		$C_7H_{12}NO$	126,0913	-0,44		

Продолжение таблицы 4

Метаболит / Metabolite	Брутто-формула молекулы / Molecular brutto formula	Брутто-формула иона / Ionic brutto formula	Теор. m/z / Calc. m/z	Отклонение, Δm/z / Mass shift, Δm/z	Удерживание / Retention	
					Время, мин / Time,min	Индекс / Index
A1 AC	$C_{23}H_{25}NO_5$	$C_{23}H_{25}NO_5$	395,1727	-0,37	11,44	3070
		$C_{15}H_{13}O_3$	241,0859	0,13		
		$C_7H_{12}NO$	126,0913	0,11		
A2 2TMS	$C_{27}H_{39}NO_5Si_2$	$C_{26}H_{36}NO_5Si_2$	498,2127	0,17	11,68	3104
		$C_{19}H_{27}O_3Si_2$	359,1493	-0,26		
		$C_7H_{12}NO$	126,0913	0,11		
A2 2AC	$C_{25}H_{27}NO_7$	$C_{17}H_{15}O_5$	299,0914	2,2	14,94	3435
		$C_{15}H_{13}O_4$	257,0808	0,50		
		$C_7H_{12}NO$	126,0913	0,23		
A3	$C_{22}H_{25}NO_5$	$C_{21}H_{25}NO_3$	339,1829	-0,10	11,43	3071
		$C_{14}H_{13}O_3$	229,0859	-0,39		
		$C_7H_{12}NO$	126,0913	-0,07		
A3 TMS	$C_{25}H_{33}NO_5Si$	$C_{24}H_{30}NO_5Si$	440,1888	0,01	11,58	3092
		$C_{17}H_{21}O_3Si$	301,1254	-0,47		
		$C_7H_{12}NO$	126,0913	-0,13		
A3 AC	$C_{24}H_{27}NO_6$	$C_{24}H_{27}NO_6$	425,1833	0,07	12,18	3175
		$C_{16}H_{15}O_4$	271,0965	0,27		
		$C_7H_{12}NO$	126,0913	0,11		

Примечание.

BTMS – trimethylsilylation; AC – acetylation.

Данные авторов.

Note.

TMS, trimethylsilylation; AC, acetylation.

Authors' data.

которых определяется состоянием этого остатка. Для неизмененного BZ она равна 183 и увеличивается до 199 (+16) при моногидроксилировании и до 229 (+32, +14) – при дигидроксилировании и метилировании, рисунки 10А и 11А. Дериватизация ведет к увеличению этих масс на массы остатков дериватизирующих агентов. Особенностью масс-спектров дериватов TMS можно назвать элиминирование метила с образованием ионов с *m/z* [M-15]; такие ионы присутствуют в масс-спектрах, даже если отсутствуют молекулярные ионы. Для дериватов AC наблюдается легкое элиминирование карбена

(C_2H_2O), в результате чего в масс-спектрах появляются интенсивные ионы с разницей масс 42 Да, рисунки 9В, 9Д и 10В. Ионы с *m/z* 105 ($C_7H_5O^+$) могут являться ароматическими семичленными циклами (ион тропилия), что объясняет их значительную интенсивность. Они образуются только при наличии неизмененного фенильного остатка и поэтому отсутствуют в масс-спектрах дериватов дигидроксилированного метаболита A2, рисунки 10Г и 10Д.

Интересной особенностью фрагментации производных BZ можно считать выброс молекулы CO_2 из молекулярного иона (*m/z* 309 и

339 для А1 и А3 соответственно), что наблюдалось и в условиях ЭРИ (ЖХ-МСВР, см. выше). Для этого необходима внутримолекулярная перегруппировка, и она, возможно, обусловлена наличием объемных остатков у одного атома углерода.

Ввиду явного улучшения форм хроматографических пиков (рисунки 11Г и 11Д), дериватизацию следует считать весьма желательной для повышения чувствительности и селективности обнаружения. Дериватизация ТМС выглядит более предпочтительной ввиду меньшего удерживания по сравнению с АС (для АС деривата метаболита А2 индекс удерживания 3435). Тем не менее, для любого способа дериватизации рекомендуется применять быстрое повышение температуры колонки и значительную максимальную температуру (не менее 300 °C).

Временные профили экскреции ВZ и его метаболитов с мочой и общие закономерности. Зависимости экскреции токсиканта и его метаболитов с мочой могут иметь сложный характер, определяемый всей совокупностью факторов – от абсорбции до почечной элиминации, включая биотрансформацию и возможное депонирование [25]. Обычно временные профили содержания неизмененного вещества и его метаболитов в моче имеет вид колоколообразной кривой, максимум которой достигается через несколько часов после экспонирования и зависит от концентрации в крови [26]. Это общее правило соблюдается для неизмененного ВZ и большинства метаболитов; тем не менее, в поведении ряда метаболических форм были отмечены значительные отличия. На рисунке 12 приведены зависимости площадей хроматографических пиков некоторых метаболитов от времени сбора мочи после экспонирования (данные нормированы к моче, собранной в течение 4 ч).

Можно отметить, что пищевая концентрация для ВZ и для гидроксилированного N-оксида М7.6 наблюдается падение концентрации с увеличением времени для обоих способов экспонирования. Это поведение характерно для большего числа метаболитов при внутрижелудочном введении и почти половины – при внутривенном. С другой стороны, для глюкуронида моногидроксилированной формы (М6.6) и, тем более, для глюкуронида дигидроксилированной метилированной формы (М7.15) отмечен рост, причем для последнего – очень значительный, при обоих способах экспонирования. Этот результат коррелирует с относительной концентрацией метаболитов в плазме крови (рисунок 9), и – в целом – свидетельствует о малом вкладе

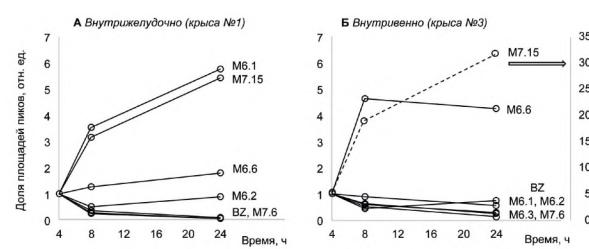


Рисунок 12 – Зависимость площадей хроматографических пиков ВZ и некоторых метаболитов от времени после внутрижелудочного (А) и внутривенного (Б) введения. Данные нормированы к 4 ч (ЖХ-МСВР, крыса №2); зависимость для метаболита М7.15 (Б) относится к правой шкале ординат (данные авторов)
Figure 12: Dependence of the areas of chromatographic peaks of BZ and some metabolites on the time after intragastric (A) and intravenous (B) administration. The data are normalized to 4 hours (LC-HRMS, rat No. 2); the dependence for the metabolite M7.15 (B) belongs to the right ordinate scale (authors' data)

процесса абсорбции в формирование мочевых профилей. Максимум концентраций подобных метаболитов в моче следует ожидать после 24 ч, что позволяет использовать эти формы как долговременные биомаркеры отравления ВZ. Наблюдаемые зависимости находятся в полном соответствии с длительностью психоактивного действия ВZ, отмеченного в работах [3, 4]. Можно предположить депонирование ряда метаболитов ВZ в тканях, но, к сожалению, нам ничего неизвестно об их психоактивности.

Необычное поведение в плане экскреции можно отметить также для простейших моногидроксилированных изомерных форм (М6.1 и М6.2), различающихся от способа экспонирования: в отличие от форм, перечисленных выше, эти метаболиты образованы в результате однократной модификации.

Представленные данные статистически недостаточны для формирования надежных обобщений о различиях мочевых метаболических профилей при разных способах введения. Тем не менее, для внутривенного введения можно отметить следующее.

1. Большое относительное содержание ВZ.
2. Малая степень глюкуронидирования ВZ, HDPA, моно- и дигидроксилированных метаболитов.
3. Очень малое относительное содержание N-окисленного метаболита (М6.3).

Данные отличия могут быть обусловлены различием изоформ окислительных ферментов, принимающих участие в окислении

Структурная идентификация и сравнительная оценка содержания метаболитов инкапаситанта BZ в моче... Structural identification and comparative assessment of the content of BZ incapacitant metabolite in rat urine...

BZ, и долей внепеченочных метаболических модификаций.

Заключение

BZ подвержен интенсивному метаболизму для крыс, заключающемуся в гидролизе, моно- и полигидроксилировании фенильных остатков, а также N-окислении. Гидроксилирование хинуклидинового остатка малозначительно. При метаболическом окислении молекула BZ может приобретать до пяти атомов кислорода, хотя наибольшей площадью хроматографических пиков характеризовались моно- и дигидроксилированные метаболиты, включая N-оксиды. Гидроксилированные метаболиты глюкуронидированы в средней и высокой степени, но при внутривенном введении степень глюкуронидирования уменьшается; также снижается содержание N-окисленного метаболита. Гидроксилированные метаболиты подвержены метилированию и продукты этого процесса также образуют глюкурониды. Из всех идентифицированных метаболитов наибольшей

площадью в условиях ЖХ-МСВР обладал продукт дигидроксилирования с последующим метилированием и глюкуронидированием (M7.15). Концентрация этого метаболита, как и ряда других в моче, росла со временем. В плазме крови, отобранной при 24 ч после введения BZ, относительная интенсивность M7.15 была наибольшей, в то время как интенсивность неизмененного BZ была меньшей примерно на порядок величины.

Предполагается, что в случае анализа мочи человека методом ЖХ-МС наиболее удобно обнаружение продуктов моногидроксилирования и N-окисления. Для ГХ-МС целесообразно обнаружение триметилсилированных метаболитов – продукта моногидроксилирования и продукта дигидроксилирования с последующим метилированием. При анализе плазмы крови, отобранной через малое время после отравления BZ, рекомендуется обнаружение неизмененного токсиканта; при прохождении значительного времени (сутки и более) – BZ и метаболита M7.15.

Ограничения исследования / Limitations of the study

Главным ограничением исследования является поиск метаболитов BZ в моче лабораторных животных ввиду отличия метаболизма крыс от человеческого. / The main limitation of the study is the search for BZ metabolites in the urine of laboratory animals, as the metabolism of rats differs from that of humans.

Список источников / References

1. Anczyk E, Maćkowiak AM. (eds.) *Psychoactive substances, drugs and altered states of consciousness: cultural perspectives*. Katowice: Sacrum Publishing House and Authors; 2016. 204 p.
2. Gibson RE, Rzeszotarski WJ, Eckelman WC, Jagoda EM, Weckstein DJ, Reba RC. Differences in affinities of muscarinic acetylcholine receptor antagonists for brain and heart receptors. *Biochem Pharmacol*. 1983;32(12):1851–56.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(83\)90049-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(83)90049-7)
3. Palmer WG. *Field-Water Quality Standards for BZ. Technical Report*. U S Army Biomedical Research & Development Laboratory. Fort Detrick, 1990. URL: <https://apps.dtic.mil/sti/citations/ADA220896> (дата обращения: 21.09.2025)
4. Ketchum JS. *Chemical Warfare Secrets Almost Forgotten. A Personal Story of Medical Testing of Army Volunteers with Incapacitating Chemical Agents During the Cold War (1955-1975)*. Santa Rosa: ChemBooks Inc.; 2006. 360 p.
5. Rzeszotarski WJ, Gibson RE, Eckelman WC, Simms DA, Jagoda EM, Ferreira NL, et al. Analogues of 3-quinuclidinyl benzilate. *J Med Chem*. 1982;25(9):1103–06.
<https://doi.org/10.1021/jm00351a020>
6. Ball JC. Review article. Dual use research of concern: derivatives of 3-quinuclidinyl benzilate (BZ). *Mil Med Sci Lett (Voj Zdrav Listy)*. 2015;84(1):2-41.
<https://doi.org/10.31482/mmsl.2015.001>
7. Misik J, Korabecny J, Nepovimova E, Kracmarova A, Kassa J. Effects of novel tacrine-related cholinesterase inhibitors in the reversal of 3-quinuclidinyl benzilate-induced cognitive deficit in rats--Is there a potential for Alzheimer's disease treatment? *Neurosci Lett*. 2016;612:261-68.
8. Zhang JJ, Fu H, Lin R, Zhou J, Haider A, Fang W, et al. Imaging Cholinergic Receptors in the Brain by Positron Emission Tomography. *J Med Chem*. 2023;66(16):10889–916.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00573>
9. Akashita G, Nakatani E, Tanaka S, Okura T. Development of simultaneous determination of dopamine 2, histamine 1, and muscarinic acetylcholine receptor occupancies by antipsychotics using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2024;127: 107518.

Коваленко И.И., Ярлыченко А.С., Ставитская Я.В., Колосова Н.А., Рыбальченко И.В., Григорьев А.М.
Kovalenko I.I., Iarlychenko A.C., Stavitskaya Y.V., Kolosova N.A., Rybalchenko I.V., Grigoryev A.M.

10. Innis RB, Tune L, Rock R, Depaulo R, U'Prichard DC, Snyder SH. Tricyclic antidepressant radioreceptor assay. *Eur J Pharmacol.* 1979;58(4):473-77.
[https://doi.org/10.1016/0014-2999\(79\)90319-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(79)90319-4)
11. Григорьев АМ, Фатеенков ВН. Современные психоактивные вещества и их обнаружение в биомедицинских пробах. *Вестник войск РХБ защиты.* 2022;6(4):320-341.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2022-6-4-320-341>
12. Григорьев АМ, Яшкир ВА, Крылов ВИ, Колосова НА, Фатеенков ВН. Идентификация EA-3167, структурного аналога инкаспитанта BZ, в объектах, доставленных из зоны проведения специальной военной операции, и обнаружение его метаболитов в моче при экспонировании крыс. *Вестник войск РХБ защиты.* 2024;8(1):18-33.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-1-18-33>
13. Grigoryev AM, Jashkir VA, Kryliv VI, Kolosova NA, Fateenkov VN. Identification of EA 3167, a Structural Analogue of the BZ Incapacitant, in Objects Delivered from the Zone of a Special Military Operation and Detection of Its Metabolites in Urine during Exposure of Rats. *Journal of NBC Protection Corps.* 2024;8(1):18–33. EDN:hrotqc (in Russian).
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-1-18-33>
14. Sng MT, Ng WF. In-situ derivatisation of degradation products of chemical warfare agents in water by solid-phase microextraction and gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *J Chromatogr. A.* 1999;832(1-2):173-82.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(98\)00990-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(98)00990-x)
15. Valdez CA, Leif RN, Vu AK, Salazar EP. Trotylation of 3-quinuclidinol, a key marker for the chemical warfare agent 3-quinuclidinyl benzilate, for its enhanced detection at low levels in complex soil matrices by electron ionization gas chromatography-mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2021;35(15):e9123.
<https://doi.org/10.1002/rcm.9123>
16. Kuitunen ML, Dutoit JC, Siegenthaler P. Identification of acidic degradation products of chemical warfare agents by methylation with trimethylsilyldiazomethane and gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Sci Technol.* 2022;13(29):1-13.
<https://doi.org/10.1186/s40543-022-00338-1>
17. Black RM, Read RW. Application of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry, and tandem mass spectrometry, to the analysis and identification of degradation products of chemical warfare agents. *J Chromatogr A.* 1997;759(1-2):79-92.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00763-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00763-7)
18. Read RW, Black RM. Rapid screening procedures for the hydrolysis products of chemical warfare agents using positive and negative ion liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J Chromatogr A.* 1999;862(2):169-77.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(99\)00944-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(99)00944-9)
19. Byrd GD, Sniegowski LT, White VE. Development of a confirmatory chemical test for exposure to 3-quinuclidinyl benzilate (BZ). *Chem Abstr.* 1987;110:70602
20. Byrd GD, Sniegowski LT, White VE. Determination of 3-quinuclidinyl benzilate in urine. *J Res Natl Bur Stand.* 1988;93:293-95.
<https://doi.org/10.6028/jres.093.050>
21. Byrd GD, Paule RC, Sander LC, Sniegowski LT, White E, Bausum HT. Determination of 3-quinuclidinyl Benzilate (QNB) and Its Major Metabolites in Urine by Isotope-Dilution Gas-Chromatography Mass-Spectrometry. *J Anal Toxicol.* 1992;16:182-7.
<https://doi.org/10.1093/jat/16.3.182>
22. Uher M, Mžík M, Karasová JŽ, Herman D, Čechová L, Dlabková A, Hroch M. In vitro and in vivo metabolism of 3-quinuclidinyl benzilate by high-resolution mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2020;120:113519
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113519>
23. Herman D, Dlabkova A, Cechova L, Vanova N, Misik J, Jun D, Zdarova Karasova J. Simple validated method of LC-MS/MS determination of BZ agent in rat plasma samples. *Drug Test Anal.* 2020;12(4):431-38.
<https://doi.org/10.1002/dta.2742>

Структурная идентификация и сравнительная оценка содержания метаболитов инкапаситанта ВЗ в моче... Structural identification and comparative assessment of the content of BZ incapacitant metabolite in rat urine...

24. Dlabkova A, Herman D, Cechova L, Hroch M, Vanova N, Zdarova Karasova J. 3-Quinuclidinyl benzilate (agent BZ) toxicokinetics in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2021;129(3):246-55.
<https://doi.org/10.1111/bcpt.1362>
25. Бонитенко ЕЮ, Бонитенко ЮЮ, Бушуев ЕС, Головко АИ, Горбачева ТВ, Куценко СА и др. *Острые отравления лекарственными средствами и наркотическими веществами.* СПб.: ЭЛБИ-СПб; 2010. 440 с.
 Bonitenko EYu, Bonitenko YuYu, Bushuev ES, Golovko AI, Gorbacheva TV, Kucenko SA, et al. *Acute poisoning by drugs and narcotic substances.* SPb.: ELBY- SPb; 2010. 440 p.(in Russian).
26. Веселовская НВ, Коваленко АЕ. *Наркотики.* М.: Триада-Х; 2000. 206 с.
 Veselovskaya NV, Kovalenko AE. *Narkotics.* M.: Triada-X; 2000. 206 p.(in Russian).

Вклад авторов / Authors' contributions

Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **И.И. Коваленко** – написание текста рукописи, работа с табличным материалом; **А.С. Ярлыченко** – доработка текста, составление рисунков; **Я.В. Ставитская** – редактирование текста рукописи; **Н.А. Колосова** – редактирование текста рукописи, работа с табличным материалом; **И.В. Рыбальченко** – редактирование текста рукописи, доработка текста; **А.М. Григорьев** – формирование концепции статьи, написание текста рукописи / All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. The most significant contribution were as follows: **I.I. Kovalenko** – writing of the article, tabular work; **A.C. Iarlychenko** – revision of the text, prepared the figures; **Y.V. Stavitskaya** – revision of the text; **N.A. Kolosova** – revision of the text, tabular work; **I.V. Rybalchenko** – editing of the article, revision of the text, editing of the article; **A.M. Grigoryev** – elaboration of the concept of the paper, writing of the article.

Сведения о рецензировании / Peer review information

Статья прошла двустороннее анонимное «слепое» рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе / The article has been doubleblind peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board and from Russian Science Citation Index database.

Об авторах / Authors

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации, 111024, Российская Федерация, г. Москва, проезд Энтузиастов, д. 19.

Коваленко Ирина Игоревна. Младший научный сотрудник.

Ярлыченко Алексей Сергеевич. Младший научный сотрудник.

Ставитская Яна Вадимовна. Научный сотрудник.

Колосова Наталья Александровна. Старший научный сотрудник, канд.биол.наук.

Рыбальченко Игорь Владимирович. Главный научный сотрудник, д-р хим. наук.

Григорьев Андрей Михайлович. Старший научный сотрудник, д-р хим. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5971-598>

Контактная информация для всех авторов: 27nc_l@mil.ru

Контактное лицо: Григорьев Андрей Михайлович; 27 nc_1@mil.ru

27 Scientific Center Named after Academician N.D. Zelinsky of the Ministry of Defence of Russian Federation, 111024, Russian Federation, Moscow, Entuziastov Proezd, 19.

Irina I. Kovalenko. Researcher.

Aleksey S. Iarlychenko. Researcher.

Jana V. Stavitskaya. Researcher.

Nataliya A. Kolosova. Senior Researcher. PhD.

Igor V. Rybalchenko. Senior Researcher. Dr Sci. (Chem).

Andrej M. Grigoryev. Senior Researcher. Dr Sci. (Chem).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5971-5989>

Contact information for all authors: 27 nc_l@mil.ru

Contact person: Andrej M. Grigoryev; 27nc_l@mil.ru