

4. Библиотека масс-спектров электронной ионизации MSLIBRARYEKBDRUGS (авторы: В.П. Мелкозеров, В.А. Шевырин. Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2015621086).

ВЛИЯНИЕ УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ПРИ СКРИНИНГЕ КРОВИ

¹Катаев С.С., ²Дворская О.Н., ¹Крохин И.П.

¹ ГКУЗОТ «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы».

² ГБОУ ВПО Пермская государственная фармацевтическая академия
Министерства здравоохранения Российской Федерации
г. Пермь, Россия

Скрининговые исследования являются важной частью экспертной практики в рамках судебно-химических и химико-токсикологических исследований биообъектов и вещественных доказательств. Учитывая широчайший спектр токсикантов в настоящее время и тенденцию к расширению их ассортимента, а также различие их физико-химических свойств, разработка скрининговой методики исследования крови на наличие лекарственных и наркотических веществ является весьма актуальной задачей.

Авторами в течение ряда лет проводились исследования по разработке скрининговой методики крови с использованием метода твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием [1] и ее оптимизации [2, 3].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния уксусной кислоты на этапе промывки в методе ТФЭ на эффективность экстракции наркотических и лекарственных веществ с использованием модифицированной методики скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови.

Материал и методы

Оборудование. Газовый хроматограф *Agilent 7820*, масс-селективный детектор *Agilent 5975* (*Agilent*, США), колонка капиллярная *HP-5MS*, внутренний диаметр 0,25 мм, длина 30 м, толщина пленки 0,25 мкм. Система с вакуумной камерой на 12 позиций (*Supelco*), насос низкого вакуума *AIR CADET*, США, картриджи *Sampli Q Evidex* – 200 мг-3 мл (*Agilent*, США). Термоблок ПЭ-4030, одноканальный испаритель ПЭ-2300, микровстряхиватель ПЭ-2 (ОАО «Экрос», Россия). Полуавтоматические

пипетки-дозаторы, позволяющие отбирать объемы жидкостей 4-40, 40-200 мкл и 0,2-1, 1-5 мл.

Материалы. Кислота салициловая (ГФ X, ФС 21), кокаина гидрохлорид (ГФ X, ФС 167), изониазида (ГФ X, ФС 357), морфина гидрохлорид (ФС 413, ГФ X), амфетамина сульфат (ГФ X, ФС 513), фенобарбитал (ГФ X, ФС 517), реланиум (ампулы, 2 мл с содержанием диазепам – 5 мг/мл, Polfa, Польша), метиндол (ампулы, 2 мл с содержанием индометацина 30 мг/мл, Polfa, Польша), субстанция кеторолака трометамин («Чемо Иберика С. А.», Испания). Бензоилэргонин, эргонин готовили из кокаина гидрохлорида согласно публикации [10]. 2,2,3,3,3-Пентафтор-1-пропанол (*Sigma-ALDRICH CHEMI*, Германия), метилйодид (Вектон, Шосткинский завод химреактивов, Россия).

Буферный раствор 1/15 М фосфатный буфер pH 4,8.

Органические растворители: дихлорметан (х.ч.), пропанол-2 (х.ч.), 95% этанол (х.ч.), гексан (о.х.ч.), этилацетат (х.ч.), 99,6% метанол (х.ч.).

Прочие реактивы: аммиака раствор концентрированный 25% (ГФ XII), уксусная кислота ледяная (ГФ XII), азот (о.с.ч.), гелий (о.с.ч.).

Спиртовые растворы стандартов (№1, №2, №3, №4) содержали:

№1- индометацин 0,1 мг/мл, кеторолак 0,02 мг/мл, салициловая кислота 0,1 мг/мл, фенобарбитал 0,2 мг/мл; №2- амитриптилин 0,02 мг/мл, амфетамин 0,02 мг/мл, диазепам 0,02 мг/мл, морфин 0,01 мг/мл; №3- изониазид 0,06 мг/мл; №4 - кокаина гидрохлорид 0,01 мг/мл, бензоилэргонин 0,01 мг/мл, эргонина гидрохлорид 0,005 мг/мл.

Интактную донорскую кровь до исследования хранили при – 18 °С.

Скрининг лекарственных и наркотических веществ в крови методами ТФЭ и ГХ/МС

Пробоподготовка. Во флакон вносили 0,5 мл крови, прибавляли по 50 мкл растворов стандартов (№1, №2, №3, №4), 2 мл 1/15 М буфера фосфатного pH 4,8. Флаконы плотно укупоривали и помещали в ультразвуковую баню на 5 минут. Содержимое флаконов центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут, центрифугат отделяли от осадка.

Процедура твердофазной экстракции. Кондиционирование сорбента проводили путем последовательного пропускания через картридж 2 мл 95% этанола и 2 мл 1/15 М буфера фосфатного (pH 4,8). Далее загружали образец со скоростью 1 мл/мин. Промывку осуществляли последовательно со скоростью 2-3 мл/мин: 1 мл 1/15 М буфера фосфатного (pH 4,8), 0,1 М раствора уксусной кислоты (или без данной позиции), 1 мл 10% этанола. Сушку патрона проводили под вакуумом в течение 20 минут.

Элюат I. Элюировали дважды по 2 мл смеси н-гексан–этилацетат (2:1).
Элюат II. Элюировали дважды по 2 мл смеси дихлорметан–*изо*-пропанол–25% аммиак (2:1:0,1).

Для оценки эффективности экстракции к элюатам I и II прибавляли 50 мкл спиртового раствора 1 мг/мл динонилфталата (ДНФ). Далее элюаты I и II испаряли в токе азота при 40 °С.

Дериватизация и исследование.

Метилирование. К сухому остатку элюата I прибавляли 500 мл безводного ацетона, 40 мкл йодистого метила и 20-25 мг безводного карбоната калия, герметично закрывали и нагревали при 60°С в течение 1 часа в термоблоке. Флакон охлаждали, отбирали жидкую фазу реакционной смеси, переносили в виалу и испаряли в токе азота при комнатной температуре. Сухой остаток растворяли в 100 мкл безводного этилацетата и 1 мкл вводили в инжектор ГХ/МС.

Ацетилирование и этерификация.

Стадия 1 (ацетилирование). К сухому остатку элюата II прибавляли 40 мкл безводного пиридина и 60 мкл уксусного ангидрида (замывая стенки флакона), флакон плотно закупоривали и выдерживали 30 минут при 80°С. После охлаждения флакон вскрывали и выпаривали избыток реагентов в токе азота (до 40°С).

Стадия 2 (этерификация). К сухому остатку прибавляли 20 мкл 2,2,3,3,3-пентафтор-1-пропанола и 60 мкл уксусного ангидрида (замывая стенки флакона), флакон плотно закупоривали и выдерживали 30 минут при 60°С. После охлаждения флакон вскрывали и выпаривали избыток реагентов в токе азота (до 40°С). Сухой остаток растворяли в 100 мкл безводного этилацетата и 1 мкл вводили в инжектор ГХ/МС.

Режим работы газового хроматографа с масс-селективным детектором. Скорость потока газа-носителя (гелий) через колонку 1,5 мл/мин, режим работы split/splitless (деление потока 15:1, с задержкой включения 1 мин после ввода пробы). Температура испарителя хроматографа и интерфейса детектора задавалась 250 и 280°С. Температура колонки начальная 70°С в течение 2 мин и прогрев до 280°С со скоростью программирования 20 град/мин, выдержка при конечной температуре 12,5 мин. Напряжение на умножителе масс-селективного детектора устанавливали равной величине автоматической настройки детектора. Регистрация масс-спектров для метильных и ацетильных производных в режиме полного сканирования ионов в интервале масс 42-450 а.е.

Обработку хроматограмм с целью идентификации компонентов проб проводили с использованием программ *ChemStation G1701DA* и *AMDIS*.

Результаты и обсуждение

Применение уксусной кислоты на этапе промывки в методе ТФЭ после внесения образца может оказывать значительное влияние на эффективность экстракции аналитов (наркотических и лекарственных веществ). Сравнение эффективности экстракции модельных соединений из крови проводили на патронах для ТФЭ со смешанной фазой, используя модифицированную методику [2,3]. Полученные результаты приведены в таблице.

Таблица.

Эффективность экстракции модельных соединений из крови, % (n=6)*

Соединение	0,1 М уксусн.к-та		без уксусн.к-ты	
	Элюат I	Элюат II	Элюат I	Элюат II
Салициловая кислота	0,9 (±90)		0,8 (±91)	
Кеторолак	46 (±8)		27 (±13)	
Индометацин	97 (±5)		101 (±5)	
Фенобарбитал	66 (±9)		88 (±8)	
Диазепам	18 (±40)	49 (±20)	61 (±10)	
Амфетамин		86 (±4)		93 (±5)
Изониазид		0,45 (±12)		0,69 (±33)
Амитриптилин		54 (±4)		53 (±14)
Кокаин		76 (±6)		79 (±6)
Бензоилэкгонин		60 (±5)		48 (±9)
Экгонин	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Морфин		9 (±12)		24 (±19)
Эналаприл		94 (±9)		78 (±10)

*- в скобках приведены относительные стандартные отклонения н.д. – не детектируется

Как видно из полученных результатов, на эффективность экстракции (ЭЭ) большинства модельных соединений влияние дополнительного этапа с применением уксусной кислоты отсутствует, либо оно не значительно. К данной группе относятся: салициловая кислота, индометацин, фенобарбитал, амфетамин, изониазид, амитриптилин, кокаин, эналаприл и, соответственно, таким образом, можно предположить аналогичное поведение наркотических и лекарственных веществ, близких по физико-химическим свойствам к перечисленным выше модельным соединениям.

Для кеторолака и бензоилэкгонина применение стадии промывки с уксусной кислотой ведет к росту ЭЭ: для кеторолака более чем на 40%, для бензоилэкгонина - порядка 20%. Увеличение ЭЭ для кеторолака обусловлено подавлением диссоциации карбоксильной группы, для

бензоилкголина данный эффект можно объяснить подавлением образования цвиттер-иона.

При этом следует отметить, что применение уксусной кислоты ведет к значительному снижению ЭЭ морфина, более чем на 60 %.

В случае использования промывки 0,1 М раствором уксусной кислоты диазепам определяется в обоих элюатах, однако, без данной стадии он полностью извлекается в элюат I. Распределение по элюатам для высоколипофильных и слабоосновных соединений, таких как 1,4-бензодиазепины, может приводить к ухудшению чувствительности метода определения.

Таким образом, наблюдается разнонаправленная динамика влияния промывки уксусной кислотой на эффективность экстракции лекарственных и наркотических веществ с различными физико-химическими свойствами. Учитывая, что изложенный метод ТФЭ рассматривается как скрининговый, на наш взгляд, оптимальным его применение будет в варианте без использования стадии промывки 0,1 М раствором уксусной кислоты. Что также актуально в рутинных экспертных исследованиях с точки зрения экономии времени, трудозатрат и реактивов.

Список литературы:

1. Катаев С.С., Дворская О.Н. Применение твердофазной экстракции в исследовании крови на наркотические и лекарственные вещества. *Судебно-медицинская экспертиза*. **2012**. 55(4): 38-42.
2. Дворская О.Н., Катаев С.С., Крохин И.П. Определение ряда нестероидных противовоспалительных средств в крови в скрининге методами твердо-фазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Бутлеровские сообщения*. **2015**; 43(7): 149-153.
3. Дворская О.Н., Катаев С.С., Силина Т.А., Крохин И.П. Оценка концентрации некоторых нестероидных противовоспалительных средств в процедуре скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови. *Судебно-медицинская экспертиза*. **2016**; 59(3): 24-30.

ИОНОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ЯДОВ ПРИРОДНОГО И СИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Кизим Е.Г., Петухова И.Ю.

Национальный Фармацевтический Университет, г. Харьков, Украина

В настоящее время в медицинской практике находят широкое применение лекарственные вещества основного характера. К ним относятся алкалоиды, а также синтетические вещества, являющиеся