
.....

**ЧЕЛЯБИНСКОЕ ОБЛАСТНОЕ БЮРО СУДЕБНО-
МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ**

**Практическое руководство по скринингу лекарственных,
наркотических веществ и их метаболитов методом газовой
хроматографии с масс - селективным детектором для целей
судебной токсикологии**

(Часть I)

Челябинск

2001

Практическое руководство по скринингу лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов методом газовой хроматографии с масс - селективным детектором для целей судебной токсикологии. Часть I //Челябинск, Челябинское областное бюро СМЭ, 2001, 62 с.

Руководство подготовлено экспертом судебно-химического отделения Челябинского Областного бюро СМЭ, к.х.н. Мелентьевым А.Б.

Содержание

Список сокращений.....	3
1. Введение.....	4
1.1. Выбор биообразцов для скрининга.....	6
2. Подготовка образцов для скрининга.....	8
2.1. Влияние рН среды водной фазы на экстракцию веществ с различными кислотно-основными свойствами.....	10
2.2. Проверка степени извлечения некоторых наркотических и лекарственных веществ из биожидкостей.....	19
2.3. Дериватизация.....	27
3. Хроматографический анализ.....	32
3.1. Расчет времен удерживания.....	32
3.2. Поиск целевых соединений на хроматограммах.....	42
Литература.....	48
Приложения.....	50

Список сокращений

- Ac – ацелированное производное
- AcA – уксусный ангидрид
- BSA – (N,O-бис(триметилсилил) ацетамид
- Bu – масляный эфир
- BuOH – н-бутанол
- BuCl – бутилхлорид (хлорбутан)
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ВЭЖХ/МСД – ВЭЖХ с масс - селективным детектированием
- ГХ – газовая хроматография
- ГХ/МСД – газовая хроматография с масс-селективным детектированием
- I-BuOH – изобутанол (бутанол-2)
- Me – метиловый эфир
- HFB – гептафтормасляный эфир
- HУ- кислотный гидролиз
- pKa – отрицательный логарифм константы ионизации кислоты
- PFB – пентафторбензил производное
- PFP – пентафторпропионовый эфир
- Pr – пропиловый эфир
- Pro – пропионовый эфир
- CHCl₃ – хлороформ
- СКО – среднее квадратичное отклонение
- СМЭ – судебно-медицинская экспертиза
- SIM – селективный ионный мониторинг
- ТМАН – тетраметиламмония гидроксид
- ТМС – триметилсилил- эфир
- TFA – трифторуксусный эфир
- ФОС – фосфорорганическое соединение

1.Введение

Газовая хроматография на капиллярных колонках широко используется за рубежом в судебной и клинической токсикологии для рутинного скрининга наркотических, лекарственных веществ, их метаболитов, пестицидов и ФОС в биологических жидкостях и волосах [1-9]. Особую популярность в настоящее время приобретает систематический токсикологический анализ, проводимый методом газовой хроматографии с масс - селективным детектором, так как этот метод позволяет с высокой степенью надежности детектировать одновременно множество токсикологически важных веществ в биообразцах. В зарубежной литературе (Journal of Chromatography, Journal of Analytical Toxicology и др.) периодически публикуются обзоры, посвященные систематическому токсикологическому анализу наркотических и лекарственных веществ.

Обычная стратегия аналитической процедуры токсикологического анализа включает на первом этапе скрининговые тесты, на втором этапе подтверждающий анализ проб, дающих положительные реакции при скрининге, вторым независимым методом с количественным определением идентифицируемого вещества. Однако такая двухступенчатая процедура оптимальна для анализов, в которых идентифицируются вещества, входящие в определенный перечень, например, при допинг - контроле или анализе наркотических веществ. В судебной и особенно в клинической токсикологии, с нашей точки зрения, нельзя ограничиваться заранее определенным списком веществ, а для скрининга необходимо использовать метод, охватывающий как можно более широкий круг потенциальных токсикантов. В настоящее время в России очень быстро расширяется как круг зарубежных лекарственных психотропных средств, так и новых синтетических наркотических веществ, находящихся в незаконном обороте.

Некоторые из этих веществ (LSD, бупренорфин, производные фентанила, низкодозовые производные бензодиазепа и другие) могут быть обнаружены в биожидкостях только очень чувствительными методами, такими как ГХ/МСД или ВЭЖХ/МСД. Существуют тысячи лекарственных веществ, наркотиков, пестицидов, ФОС и других ядов, которые могут быть причиной интоксикации и смерти. Некоторые вещества в организме полностью метаболируют, тогда в моче и плазме могут быть обнаружены только их метаболиты. С другой стороны, все метаболиты должны идентифицироваться в ходе анализа и быть различимы с другими потенциальными токсикантами и с эндогенными веществами. По мнению признанных специалистов в токсикологическом анализе Н.Н. Maurer & R. A. de Zeeuw [10,11], применение неспецифических хроматографических методов, даже если их объединить, недостаточно для целей надежной идентификации, особенно в судебной токсикологии. По этой причине назрела острая необходимость в применении систематического токсикологического анализа, основанного на анализе биожидкостей методом ГХ/МСД, как наиболее универсального, высокочувствительного и специфического метода для скрининга или подтверждения наличия токсикантов в организме, которые могут быть обнаружены методом газовой хроматографии. Скрининг методом ГХ/МСД может быть проведен используя реконструированные масс-хроматограммы по характеристическим ионам или поиск по групповым ионам, предложенный Maurer Н.Н. в работах [4,7,11]. Позитивные сигналы поиска по характеристическим или групповым ионам могут быть подтверждены сравнением полных масс спектров со справочными.

В настоящей работе дан общий подход к скринингу наркотических, лекарственных веществ в биожидкостях методом ГХ/МСД, который выработан в Челябинском областном бюро судебно-медицинской

экспертизы за последние пять лет. В части 2 работы будут приведены конкретные аналитические данные для практической идентификации некоторых групп и отдельных представителей наркотических и лекарственных веществ, их метаболитов и дериватов. Следует отметить, что приведенные аналитические данные получены в результате проведения конкретной экспертной работы и не всегда охватывают идентификацию полного круга метаболитов наркотических и лекарственных веществ. Однако эти данные позволяют, как правило, обнаружить нативное вещество (если это возможно) и один или два наиболее важных метаболита, что достаточно для надежного обнаружения факта приема препаратов.

1.1. Выбор биообразцов для скрининга

Большинство авторов методик скрининга наркотических и лекарственных веществ [1,4,6,9] сходятся во мнении, что для скрининга и идентификации неизвестного лекарственного или наркотического вещества лучше всего подходит моча, так как концентрации лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов в моче велики относительно их концентрации в крови или плазме. Кроме того, в некоторых случаях в моче метаболиты обнаруживаются в более высоких концентрациях и в течение более длительного времени, чем нативные вещества [6].

Концентрации токсикологически важных веществ в плазме или цельной крови во многих случаях очень низки для проведения скрининга. Однако в литературе приведены методики, использующие ГХ с азотно-фосфорным и масс-селективным детекторами для скрининга большой группы наркотических и лекарственных веществ в крови для целей токсикологического анализа [1,12], а также методики для скрининга отдельных групп лекарственных и наркотических веществ, бензодиазепинов

[13, 14,15], барбитуратов [16], амфетаминов [17], каннабиноидов [18], фенотиазинов [19], антиэпилептиков, антидепрессантов, нейролептиков и опиатов [15, 20,21]. Трупная кровь из-за ее высокой вязкости, по сравнению с плазмой или цельной кровью живых лиц, представляет большую проблему для большинства методов пробоподготовки [9]. В большинстве случаев образцы крови или плазмы анализируются для количественного определения токсиканта, обнаруженного при скрининге мочи. Токсикологический анализ волос всегда обнаруживает только хроническую интоксикацию или неоднократное употребление [4].

В связи с вышесказанным, основным объектом скрининга на наркотические и лекарственные вещества является моча. Только при ее отсутствии для проведения скрининга берется трупная кровь. В связи с большим количеством балластных веществ, экстрагируемых из крови при ее пробоподготовке, анализ крови может гарантировать только наличие заранее оговоренного списка наркотических и лекарственных веществ. При наличии мочи из трупной крови мы проводим только анализ наиболее распространенных наркотических и психотропных веществ (группа опия, диазепам, amitriptilin, тизерцин, клозапин, димедрол) и тех, анализ которых в моче затруднен из-за интенсивного метаболизма (группа атропина). Анализ крови на опиаты помимо скрининга мочи проводится также из-за того, что при передозировке героина (особенно в сочетании с алкоголем) часто смерть наступает настолько быстро, что морфин не успевает вывестись с мочой в заметном количестве, что может дать отрицательный результат анализа мочи на опиаты [22] при наличии морфина в крови.

2. Подготовка образцов для скрининга.

Подготовка образцов биожидкостей перед анализом должна обеспечить:

1. Разрушение конъюгатов, так как большинство полярных метаболитов наркотических и лекарственных веществ выводятся с мочой в конъюгированном виде.
2. Изолирование анализируемых веществ из биоматериала.
3. Дериватизацию полярных труднолетучих наркотических, лекарственных веществ и их метаболитов.
4. Переочистку экстракта (если необходимо).

В то же время важно, чтобы при подготовке образцов в анализируемых соединениях не нарушалась их основная структура, так как это приведет к трудностям их идентификации. Для разрушения конъюгатов обычно применяется либо мягкий, но продолжительный ферментный гидролиз, либо более жесткий прямой кислотный гидролиз. Обычно ферментный гидролиз используется в допинг - контроле и для анализа некоторых групп соединений, чувствительных к кислотному гидролизу (типа 1,4 бензодиазепинов, кокаина и др.). Для токсикологических анализов (особенно срочных) обычно предпочитается кислотный гидролиз [4]. При этом обязательно необходимо учитывать возможность гидролиза соединений, имеющих сложно - эфирные и амидные связи, а также иногда и простые эфирные связи. Для целей скрининга наркотических и лекарственных веществ мы применяем кислотный гидролиз в растворе 7% соляной кислоты. Образующиеся при этом продукты гидролиза и их дериваты приведены далее в разделе, посвященном идентификации отдельных групп соединений.

В обзоре [4] Н.Н. Маугер делает вывод, что авторы методик систематического токсикологического анализа для процедур поиска неизвестного яда предпочитают жидкость - жидкостную экстракцию, как

наиболее универсальный метод изолирования. В то же время для подтверждения наличия определенного вида наркотического или лекарственного вещества предпочтение отдается твердофазной экстракции. В более позднем обзоре [9] О. Drummer пишет, что авторы предпочитают твердофазную экстракцию для подготовки образцов к анализу методом ГХ/МСД и жидкость-жидкостную экстракцию для анализа образцов с помощью ВЭЖХ.

Известно, что с помощью жидкость-жидкостной экстракции в органическую фазу извлекаются вещества, находящиеся в неионизированном виде (по принципу подобное растворяется в подобном). Зависимости доли неионизированных форм основания и кислоты от pH среды можно рассчитать по формулам:

$$\alpha_b \text{ (доля неионизированной формы основания)} = \frac{1}{(1+10^{\text{pK}_a-\text{pH}})},$$

$$\alpha_a \text{ (доля неионизированной формы кислоты)} = \frac{1}{(1+10^{\text{pH}-\text{pK}_a})},$$

где pKa – константа ионизации кислоты, сопряженной основанию.

В идеальном случае, когда неионизированная форма практически нерастворима в воде и хорошо растворима в слабополярном органическом растворителе, а ионизированная форма соединения, наоборот, нерастворима в органической среде и хорошо растворима в водной фазе, по этим же формулам можно ориентировочно рассчитать долю анализируемого соединения, извлекаемого в органическую фазу в зависимости от pH водной среды. Известно, что классические схемы химико-токсикологического анализа [23,24] предполагают отдельное изолирование и анализ соединений кислотного и основного характера. Однако при этом приходится анализировать по крайней мере 2 образца одной биожидкости, если же учитывать анализ слаболетучих и полярных метаболитов, то анализу

необходимо подвергать уже 3 и более образцов одной биожидкости. При большой загрузке судебно - химических отделений бюро СМЭ и недостатке оборудования в них анализировать большое количество образцов одной биожидкости дорого и неэффективно. Тем не менее, некоторые авторы [1,15] проводят скрининг из одной фракции биожидкости и получают удовлетворительные результаты по извлечению веществ как основного, так и кислотного характера. Это явление нельзя объяснить, если руководствоваться только описанными выше соотношениями между рН водной фазы и степенью извлечения из нее слабополярных наркотических и лекарственных веществ. Для объяснения этого явления нами поставлены модельные эксперименты по экстракции из водных растворов лекарственных веществ с разными кислотно-основными свойствами.

2.1 Влияние рН среды водной фазы на экстракцию веществ с различными кислотно-основными свойствами.

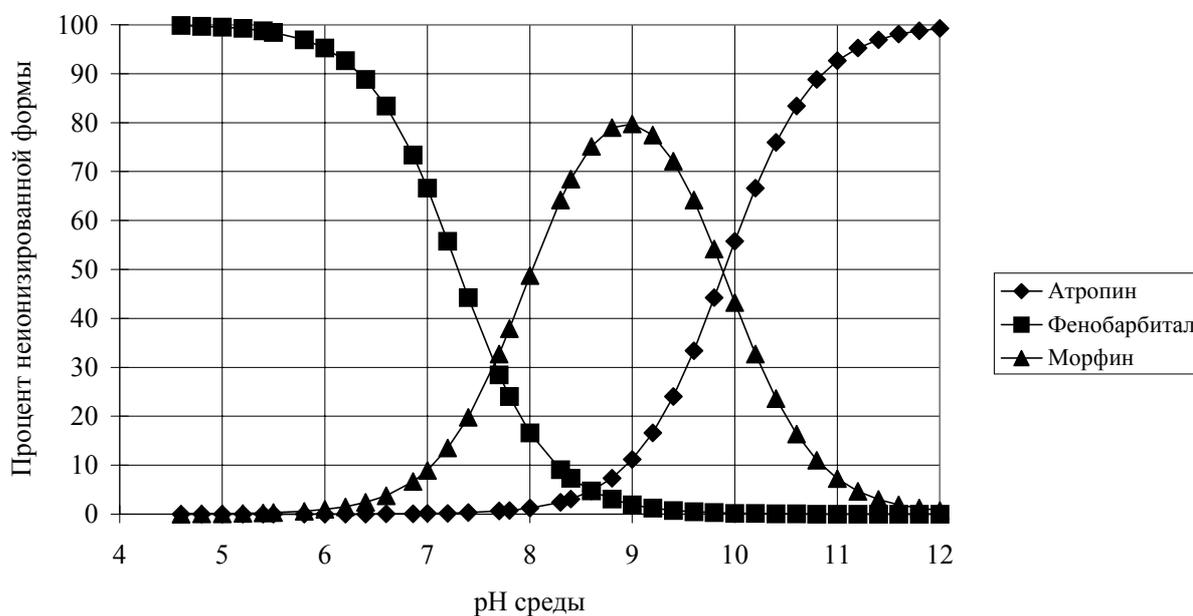
В качестве модельных выбраны 3 вещества из перечня “Токсикологических веществ, подлежащих судебно-химическому исследованию в лабораториях бюро СМЭ” (Приказ Минздрава СССР №1021 от 25.12.1973 г.), имеющих различные кислотно-основные свойства :

- фенobarбитал, вещество кислотного характера, имеет одну из самых низких $pK_a=7$,
- атропин, одно из самых сильных оснований, pK_a сопряженной с основанием кислоты = 10,
- морфин – амфолит $pK_{a1}=8$, $pK_{a2}= 9,9$.

Морфин сам по себе имеет большое токсикологическое значение и может служить моделью для исследования поведения при экстракции большого круга метаболитов, имеющих несколько полярных ОН- групп

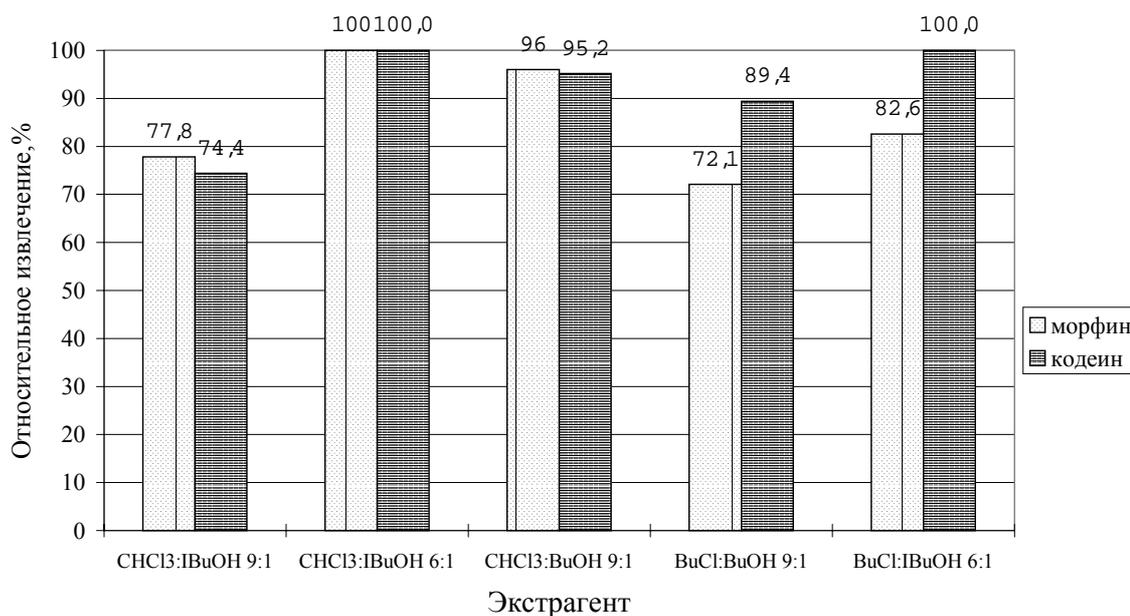
различной природы. Такие соединения гораздо более гидрофильны, чем большинство лекарственных и наркотических веществ, и с их изолированием из биожидкостей, как правило, возникают проблемы. Все три вещества удовлетворяют требованиям, необходимым для расчета степени извлечения по формулам для степени ионизации, так как их неионизированные формы хорошо растворимы в органическом растворителе (хлороформе) и слабо растворимы в воде и наоборот, ионизированные формы значительно лучше растворимы в воде, чем в органических растворителях [23]. Результаты предварительного расчета степени ионизации и доли неионизированных форм для этих веществ в зависимости от рН среды приведены на рисунке 2.1. Как видно из рисунка, нет такой области рН, в которой по расчету все три вещества имели бы значительную долю неионизированной формы и, следовательно, извлекались бы совместно в значительных количествах. Экспериментальное изучение изолирования этих веществ проведено методами экстракции (в хлороформ и смесь хлороформа с изобутанолом 6:1) и сорбции на Полисорбе-1. Смесь хлороформ - изобутанол (6:1) выбрана из известного списка смешанных растворителей для экстракции гидрофильных лекарственных веществ из водных растворов на основании проведенных экспериментов по определению степени и стабильности извлечения морфина и кодеина из мочи при рН=8,6. Результаты определения степени извлечения морфина и кодеина некоторыми смесями растворителей приведены на рисунке 2.2. За 100 % приняты максимальные степени извлечения, наблюдаемые в данных опытах. Мы не проводили эксперименты со смесями хлороформ-этанол и хлороформ-изопропанол, так как эти смеси растворителей экстрагируют очень большое количество эндогенных веществ, мешающих дальнейшему хроматографическому анализу [25]. Из рисунка видно, что наибольшая степень извлечения морфина и кодеина наблюдается для смеси хлороформ:

Рис. 2.1 Зависимости доли неионизированных форм атропина, фенобарбитала и морфина от pH среды



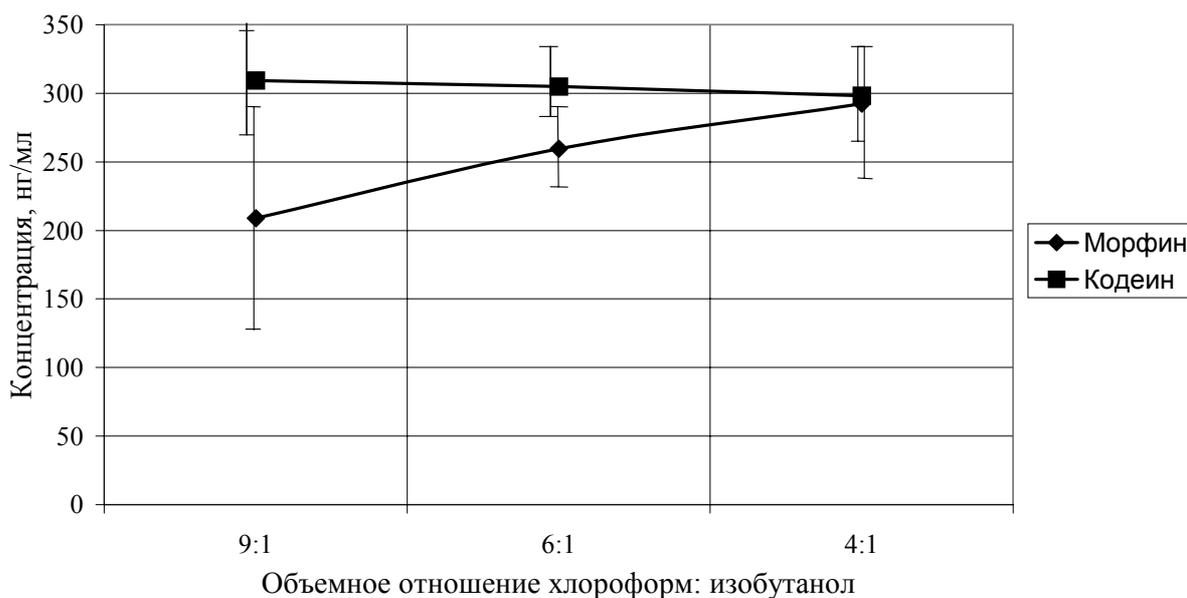
изобутанол (6:1), чуть хуже результаты получены для смеси хлороформ: н-бутанол (9:1). Объемное отношение хлороформ: изобутанол было выбрано на основе изучения воспроизводимости опытов по экстракции морфина и кодеина из мочи с концентрациями по 300 нг/мл (рекомендуемый

Рис.2.2 Относительные степени извлечения морфина и кодеина смесями растворителей



международными организациями [26] уровень Cutoff для опиатов). На рисунке 2.3 приведены, определенные в ходе опытов концентрации морфина и кодеина, а также ошибки их определения (n=8). Видно, что экстрагенты с отношением хлороформа к изобутанолу 6:1 и 4:1 обладают статистически неразличимыми средними значениями концентраций морфина и кодеина и примерно одинаковой дисперсией, однако смесь хлороформа с изобутанолом 4:1 дает больший фон эндогенных соединений в экстракте, поэтому для дальнейших исследований нами выбрана смесь хлороформ-изобутанол 6:1.

Рис.2.3 Концентрации морфина и кодеина, определенные при экстракции смесями хлороформ-изобутанол



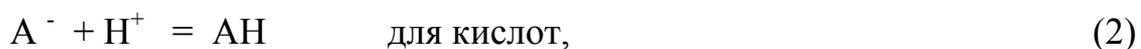
Определение степени извлечения модельных веществ экстракцией. К 1 мл буферных растворов с рН=4,3; 5,5; 6,86; 7,7; 8,3; 8,8 (фосфатные буферные растворы), 9,2; 10,0 (боратные буферные растворы) и 12,0 (аммиачный буферный раствор) добавлялось по 20 мкл этанолового раствора фенобарбитала с концентрацией 1 г/л, по 50 мкл метаноловых растворов морфина и атропина с концентрацией 0,1 г/л и по 5 мл органического растворителя. После экстракции в течение пяти минут на

встряхивателе АВУ-6М от каждой пробы отбиралось по 4 мл органического экстракта, который пропускаться через 1 г безводного сульфата натрия, слой соли промывался 1 мл хлороформа и экстракт делился пополам. В одной половине экстракта (после его испарения) методом ультрафиолетовой спектроскопии по методике [24] определено содержание фенобарбитала, а ко второй половине экстракта добавлено 10 мкл метанолового раствора основания этилморфина с концентрацией 0,3 г/л (внутренний стандарт), экстракт был испарен досуха в токе воздуха. К сухому остатку добавлялось 70 мкл BSA, смесь нагревалась 15 минут при 80°C. 1 мкл полученной смеси исследовался методом ГХ/МС на хроматографе HP-5890 с масс - селективным детектором HP-5972 в режиме SIM по ионам 361, 124, 140 (атропин -ТМС эфир), 429, 414, 401 (морфин –2ТМС эфир), 385, 357, 356 (внутренний стандарт –ТМС эфир). В качестве образцов сравнения (стандарт со 100% степенью извлечения) этими же методами исследовались 8 мкг фенобарбитала (8 мкл раствора с концентрацией 1 г/л) и смесь, состоящая из 2 мкг атропина (20 мкл раствора с концентрацией 0,1 г/л), 2 мкг морфина (20 мкл раствора с концентрацией 0,1 г/л) и 3 мкг этилморфина (10 мкл раствора с концентрацией 0,3 г/л). В качестве органической фазы при экстракции использовались хлороформ и смесь хлороформа с изобутанолом в объёмном соотношении 6:1.

Определение степени извлечения модельных веществ сорбцией. К 1 мл буферных растворов, список которых приведен выше, добавлялось по 20 мкл этанолового раствора фенобарбитала с концентрацией 1 г/л, по 50 мкл метаноловых растворов морфина и атропина с концентрацией 0,1 г/л. Полученные растворы пропускались со скоростью 1 мл/мин через предварительно кондиционированный сорбент Полисорб-1 фракции 0,1-0,25 мм, взятый в количестве 0,2 г. Сорбент кондиционировался 2 мл метанола и 2 мл соответствующего буферного раствора. После сорбции сорбент

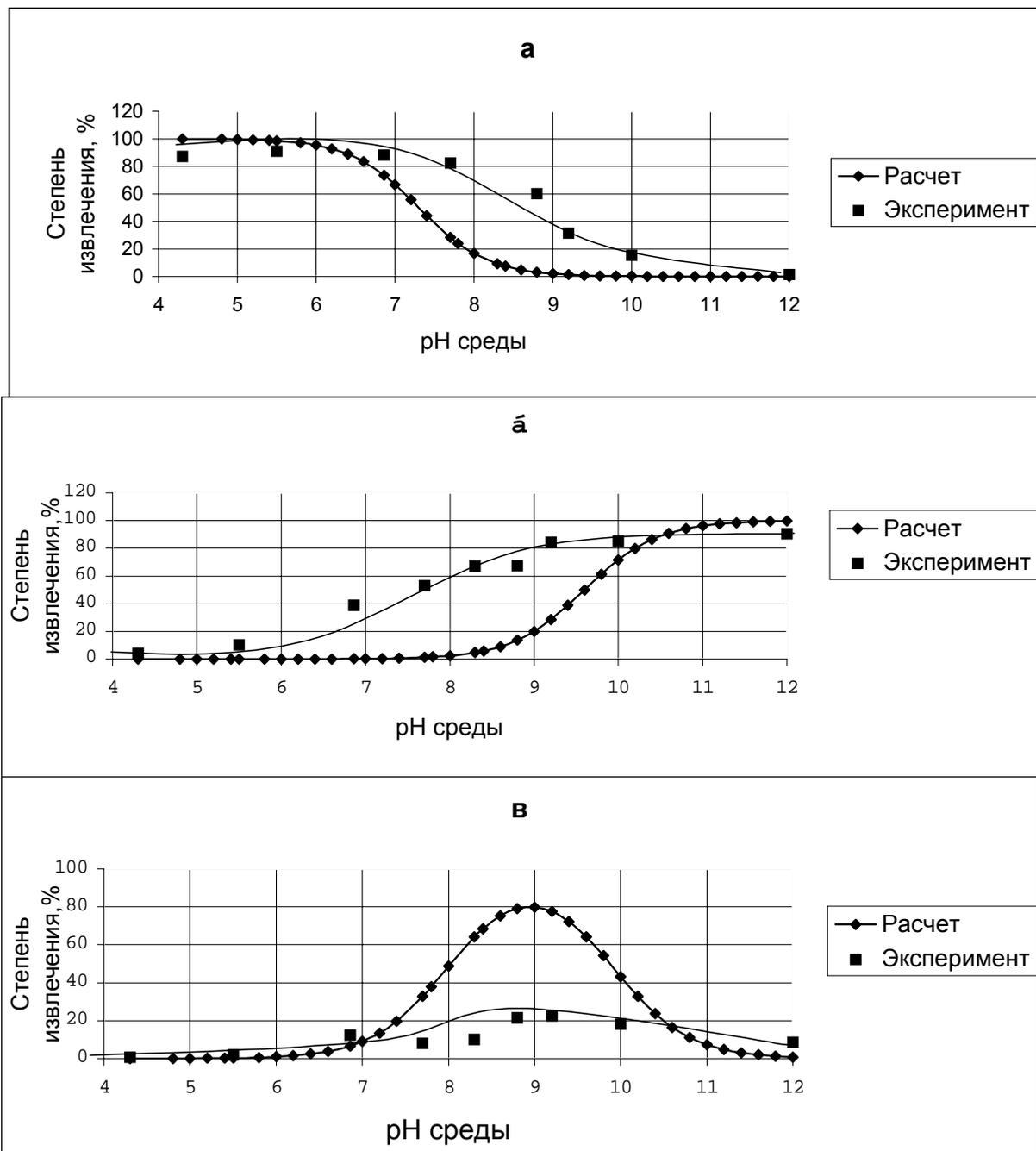
промывался 0,5 мл воды и сушился под вакуумом 15 минут. Элюирование проводилось 2 мл метанола. Далее по 2/5 метаноловых элюатов использовались для определения фенobarбитала, атропина и морфина по методикам, изложенным выше в подразделе экстракции.

Все точки эксперимента по экстракции и сорбции были проведены не менее двух раз, параллельные измерения усреднены. Результаты эксперимента приведены на рисунках. 2.4-2.7. На рисунке 2.4 приведены расчетные и экспериментальные кривые извлечения при экстракции хлороформом. Общий вид расчетных и экспериментальных кривых для фенobarбитала и атропина одинаков, однако экспериментальная кривая для фенobarбитала сдвинута по оси рН на 1,5- 2 единицы в сторону увеличения рН. Наоборот, экспериментальная кривая для атропина сдвинута по оси рН на 1,5-3 единицы в сторону уменьшения рН. Экспериментальная кривая для морфина, хоть и имеет небольшой максимум при рН около 9 (как предсказывает теория), но степень извлечения при этом не превышает 25% и нестабильна. Такой ход экспериментальных кривых извлечения для фенobarбитала и атропина может быть объяснен смещением кислотно-основного равновесия в водной фазе при контакте ее с органическим растворителем. Так как в водной фазе существует равновесие между ионизированной и неионизированной формами:



то при контакте водной фазы с органической в последнюю селективно переходят только неионизированные формы. Значительного изменения рН водной фазы из-за образования или связывания ионов H^+ по реакциям 1 и 2 также не произойдет из-за использования буферных растворов. Если продукты реакции удаляются из зоны реакции, то система стремится восста-

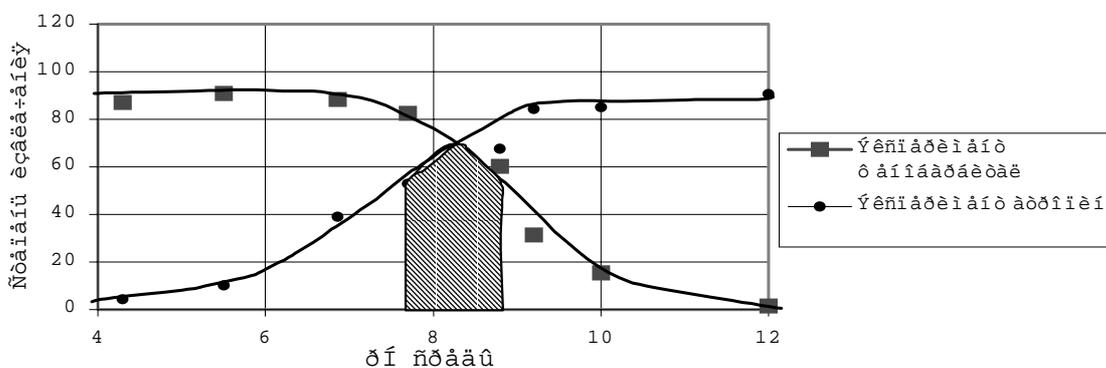
Рис.2.4 Расчетные и экспериментальные кривые степени извлечения фенобарбитала (а), атропина (б) и морфина (в) в зависимости от рН среды при экстракции хлороформом.



новить равновесие, а значит часть оставшихся в водной фазе ионизированных форм опять будет превращаться по приведенным выше реакциям в новые порции неионизированной формы и так далее. Следовательно, из-за сдвига кислотно - основного равновесия в водной фазе

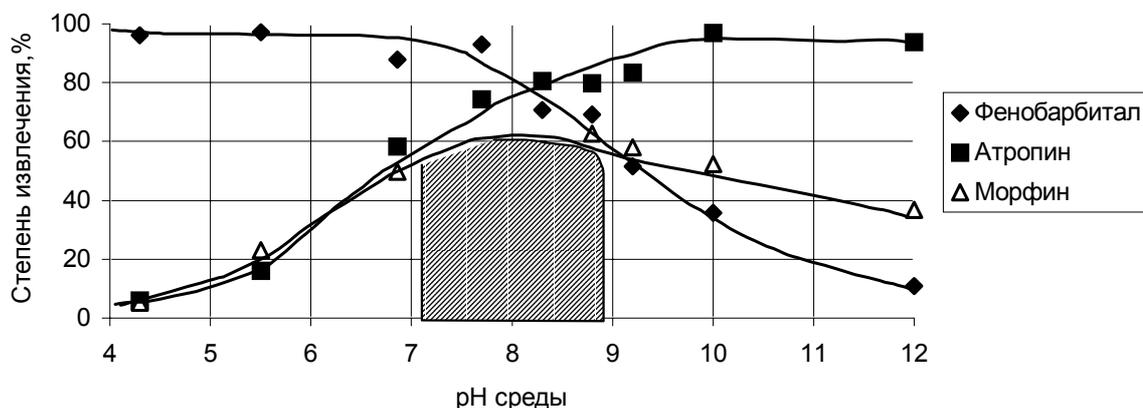
при контакте ее с органическим растворителем в органическую фазу при данном рН среды водной фазы будет переходить больше основания и больше кислоты, чем это можно ожидать при расчете по формулам для констант ионизации. Это явление мы и наблюдали на практике (см. рис.2.4). Учитывая это явление, появляется реальная возможность одновременного извлечения при определенном рН среды веществ как кислотного, так и основного характера. На рисунке 2.5 область совместного извлечения

Рис.2.5. Расчетные и экспериментальные кривые извлечения фенобарбитала и атропина в зависимости от рН среды при экстракции хлороформом



фенобарбитала и атропина заштрихована. Извлечение морфина (и большинства гидрофильных метаболитов лекарственных веществ) в хлороформ, как и ожидалось, при этих условиях находится на низком уровне. Поэтому извлечение хлороформом можно рекомендовать только для относительно слабополярных и гидрофобных веществ. Однако, известен способ увеличения извлечения полярных гидрофильных веществ повышением полярности органического растворителя за счет добавки в слабополярный растворитель более полярных компонентов [23,24]. На рисунке 2.6 приведены экспериментальные кривые извлечения фенобарбитала, атропина и морфина при экстракции смесью хлороформом - изобутанол 6:1 (по объему). Видно, что общий ход кривых для фенобарбитала и атропина по сравнению с экстракцией хлороформом

Рис.2.6. Экспериментальные кривые извлечения фенобарбитала, атропина и морфина в зависимости от рН среды при экстракции смесью хлороформ-изобутанол (6:1)

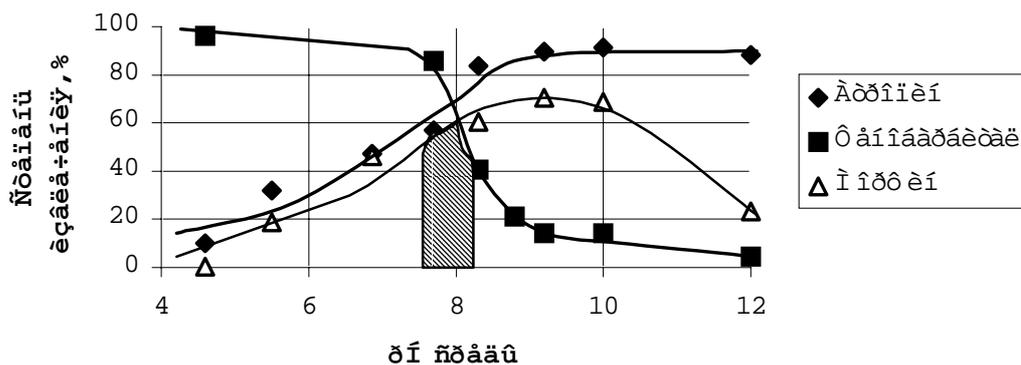


изменился мало, зато значительно поднялся уровень извлечения морфина и несколько расширилась область совместного извлечения всех трех модельных веществ (заштрихована). В этой области при экстракции смесью хлороформ : изобутанол степень извлечения не падает ниже 50 %. Это дает реальную возможность использовать область pH от 7,2 до 9 для одновременного скрининга всего круга наркотических и лекарственных веществ и их полярных метаболитов. Следует отметить, что авторы работ [1,15], предлагающих одновременное извлечение всего круга анализируемых веществ проводили это извлечение при значениях pH, близких к предлагаемой в данной работе.

На рисунке 2.7 приведены экспериментальные кривые извлечения фенобарбитала, атропина и морфина при сорбции на Полисорбе-1. Видно, что область совместного извлечения всех трех модельных веществ хотя и существует, но значительно сузилась и сместилась в область более низких pH (7,3-8,1). Несовпадение области максимального извлечения морфина (8,5-10,5) и области совместного извлечения всех трех модельных веществ

делает сорбцию на Полисорбе-1 менее технологичным вариантом для проведения скрининга, чем экстракция смесью хлороформ: изобутанол.

Рис.2.7. Экспериментальные кривые извлечения фенобарбитала, атропина и морфина в зависимости от pH среды при извлечении сорбцией на Полисорбе-1.



Таким образом, из трех опробованных вариантов извлечения модельных веществ из водной фазы в органическую для проведения скрининга рекомендуется экстракция смесью хлороформ: изобутанол (6:1) при pH водной фазы от 7,2 до 9.

2.2. Проверка степени извлечения некоторых наркотических и лекарственных веществ из биожидкостей.

С целью проверки предлагаемой области pH для извлечения широкого круга наркотических, лекарственных веществ, их метаболитов и продуктов гидролиза (для веществ, гидролизующихся в кислой среде). Нами проведены эксперименты по экстракции этих веществ из мочи после гидролиза при pH 8,4-8,6 (свежеприготовленный насыщенный раствор бикарбоната натрия) смесью хлороформ: изобутанол (6:1).

Методика эксперимента: К 1мл “холостой” мочи добавлялось до 25 мкл спиртовых растворов смеси лекарственных и наркотических веществ для

достижения их концентраций в моче на уровне 0,5-1 мкг/мл. Для определения степени извлечения метаболитов и продуктов гидролиза в качестве стандартных растворов, затравливаемых в мочу, использовались этаноловые растворы экстрактов мочи с положительных экспертиз после гидролиза мочи. К образцам добавлялось по 100 мг бикарбоната натрия. Проверялся рН среды по бумаге "Рифан" затем образцы экстрагировались 5 мл смеси хлороформ : изобутанол 6:1 (по объёму). После экстракции в течение пяти минут на встряхивателе АВУ-6М от каждой пробы отбиралось по 4 мл органического экстракта, который пропускаясь через 1 г безводного сульфата натрия. Слой соли промывался 1 мл хлороформа, к органической фазе добавлялось по 20 мкл раствора внутреннего стандарта (циклизин -0,04 г/л), растворитель испарялся в токе воздуха. К сухим остаткам добавлялось по 100 мкл метанола и 1 мкл анализировался методом газовой хроматографии на хроматографе НР-5890 с масс - селективным детектором НР-5972 в режиме SIM по двум характеристическим ионам для каждого анализируемого соединения. В качестве образца сравнения (стандарт со 100% степенью извлечения) использовалась смесь из 20 мкл тех же самых смесей лекарственных и наркотических веществ, которые затравливались в мочу, и 20 мкл раствора внутреннего стандарта (циклизин -0,04 г/л). К образцу сравнения добавлялся метанол до общего объёма 100 мкл и затем проводился анализ аналогично описанному выше способу. Некоторые соединения анализировались в виде ТМС, метиловых эфиров или ацетилованных производных. В этих случаях:

- для получения ТМС эфиров к сухим остаткам после испарения растворителей добавлялось по 70 мкл BSA, смесь нагревалась 15 минут при 80°С. 1 мкл полученной смеси исследовался методом ГХ/МСД в режиме SIM по характеристическим ионам ТМС производных анализируемых соединений;

- для получения метиловых эфиров к сухим остаткам добавлялось 20 мкл 5% раствора ТМАН в метаноле и 100 мкл безводного диметилсульфоксида. После двухминутной выдержки добавлялось 20 мкл метилиодида, смесь выдерживалась при комнатной температуре 10 минут при периодическом перемешивании. Далее к смеси добавлялось 200 мкл 0,1н раствора HCl и 3 мл хлороформа. После экстракции в течение 5 минут хлороформный слой переносился в чистый флакон и испарялся в токе воздуха досуха. К сухому остатку добавлялось 100 мкл метанола и 1 мкл исследовался методом ГХ/МСД в режиме SIM по характеристическим ионам метиловых эфиров анализируемых соединений;

- для получения ацетилированных производных к сухим остаткам после испарения растворителей добавлялось по 40 мкл уксусного ангидрида и триэтиламина, смесь нагревалась 20 минут при 80°C и избыток реагентов испарялся в токе воздуха при 40 °C. Сухой остаток растворялся в 100 мкл этилацетата и 1 мкл исследовался методом ГХ/МСД в режиме SIM по характеристическим ионам ацетилированных производных анализируемых соединений.

Образцы сравнения для этих соединений также подвергались дериватизации и анализу в виде соответствующих производных. В таблицах 2.1 и 2.2 приведены данные по степени извлечения большой группы наркотических и лекарственных веществ, а также некоторых метаболитов и продуктов гидролиза. В столбце 4 таблицы приведены названия производных, которые подвергались анализу, если анализ производился в нативном виде, в этом столбце стоит знак “-”. Из приведенных данных видно, что для большинства лекарственных и наркотических веществ, с которыми проводился эксперимент, степень извлечения при данных условиях выше 70 %, для всех остальных она не ниже 50%.

Таблица 2.1.

**Экспериментальные степени извлечения из мочи некоторых
наркотических, лекарственных веществ.**

№ п.п.	Название соединения	pKa	Производ ные	Степень извлечения, %
1	Адифенин (Спазмолитин)		-	81,5
2	Алимемазин (Терален)	9,0	-	78,0
3	Амидопирин	5,0	-	51,7
4	Аминазин (Хлорпромазин)	9,3	-	74,5
5	Амитриптилин	9,4	-	77,1
6	Амобарбитал (Барбамил)	7,9	Ме	96,2
7	Амфетамин	9,9	Ас	66,3
8	Анабазин	Н.д.	Ас	67,5
9	Атропин	10,0	ТМС	75,1
10	Ацепромазин	9,3	-	61,3
11	Барбитал	8,0	Ме	90,5
12	Бромгексин	8,5	-	86,0
13	Бутадион	4,5	-	96,9
14	Верапамил	8,9	-	54,6
15	Гексабарбитал	8,2	Ме	95,2
16	Диазепам	3,3	-	76,3
17	Диклофенак	4,2	-	89,9
18	Дифенгидрамин(Димедрол)	9,0	-	90,2
19	Динезин		-	76,7
20	Дипразин	9,1	-	63,9
21	Имизин	9,5	-	76,4
22	Индометацин	4,5	Ме	73,5

Продолжение таблицы 2.1				
№ п.п.	Название соединения	pKa	Производные	Степень извлечения,%
23	Карбамазепин		-	78,1
24	Кардиамин		-	87,9
25	Кетамин	7,5	-	99,3
26	Клозапин		Ac	85,8
27	Клонидин	8,2	Ac	73,2
28	Кодеин	8,2	Ac	86,4
29	Кокаин	8,7	-	88,8
30	Лидокаин	7,9	-	96,0
31	Маркаин (Бупивакаин)	8,1	-	84,2
32	Мебикар		-	94,5
33	Медазепам (Мезапам)	6,2	-	88,2
34	Мепробамат		-	80,2
35	Метамфетамин	9,9	Ac	68,1
36	Миансерин	7,1	-	83,1
37	Морфин	8;9,9	Ac	64,8
38	Нитразепам	3,4,10,8	-	70,6
39	Новокаин (Прокаин)	8,1	Ac	64,9
40	Окспренолол	9,5	Ac	98,2
41	Папаверин	6,4	-	77,1
42	Пентобарбитал (Этаминал)	8,0	Me	98,5
43	Промедол (Тримеперидин)		-	88,1
44	Пропранолол (Анаприлин)	9,5	Ac	94,6
45	Стрихнин	2,3;8	-	76,0

46	Супрастин (Галопирамин)		-	77,8
Продолжение таблицы 2.1				
№ п.п.	Название соединения	pKa	Производные	Степень извлечения, %
47	Тиаприд		-	57,5
48	Тизерцин (Левомепрамазин)	9,2	-	78,4
49	Тиопентал	7,5	Me	95,2
50	Тиоридазин	9,5	-	61,6
51	Трамадол	8,3	TMC	92,5
52	Триоксазин		-	92,5
53	Феназепам		-	77,8
54	Фенобарбитал	7,4	Me	89,1
55	Фентанил	8,4	-	79,8
56	Хинин	4;8,5	Ac	87,5
57	Хлордиазепоксид	4,6	-	69,8
58	Хлорпротиксен	8,8	-	73,3
59	Циклобарбитал	7,6	Me	94,5
60	Циклодол (Тригексифенидил)		-	87,1
61	Циннаризин		-	82,6
62	Эфедрин	9,6	Ac	89,2

По нашему мнению, этого уровня извлечения вполне достаточно для проведения скрининга. Работы в направлении тестирования методики и расширения круга метаболитов и продуктов гидролиза, которые могут быть идентифицированы данным методом, будут продолжены.

Таким образом, мы используем следующую методику изолирования из мочи наркотических, лекарственных веществ и их метаболитов:

Таблица 2.2

**Экспериментальные степени извлечения из мочи некоторых
метаболитов и продуктов гидролиза наркотических и лекарственных
веществ.**

№ п.п.	Название соединения	Производ ные	Степень извлечения, %
1	2-амино-5-хлорбензофенон (АХБ)	Ас	76,2
2	2-метиламино-5-хлорбензофенон (МХБ)	Ас	84,0
3	2-амино-5-бром-2'-хлорбензофенон (АБХБ)	Ас	83,0
4	2-амино-5-нитробензофенон (АНБ)	Ас	91,6
5	Дифенилметанол (продукт гидролиза дифенгидрамина)	Ас	89,5
6	1,2,5-триметил-4-фенил-пиперидил-4-ол (продукт гидролиза промедола)	Ас	74,1
7	Нортриптилин	Ас	90,9
8	Амитриптилин –М (10-гидрокси-)	ТМС	88,0
9	Амитриптилин –М (нор, 10-гидрокси-)	ТМС	85,6
10	Имипрамин-М (дезметил-)	Ас	58,2
11	Имипрамин-М (гидрокси-)	Ас	93,4
12	Имипрамин-М(дезметил, гидрокси-)	Ас	52,5
13	Клозапин –М (дезметил-)	Ас	60,1
14	Клозапин –М (гидрокси-) изомер1	Ас	89,6
15	Клозапин –М (гидрокси-) изомер2	Ас	82,3
16	Котинин	-	85,7
17	Левомепромазин –М (гидрокси-)	Ас	56,8

18	Метилэксгонин (пр-т гидролиза кокаина)	Ас	81,4
Продолжение таблицы 2.2			
№ п.п.	Название соединения	Производные	Степень извлечения, %
19	Миансерин-М	Ас	92,0
20	Пентоксифиллин –М(дегидро-)	-	84,8
21	Пентоксифилин –М2	Ас	87,9
22	Тиаприд –М(О-дезметил-)	Ас	64,7
23	Трамадол –М(О-дезметил-)	ТМС	77,6
24	Трамадол –М(N-дидезметил-)	Ас	80,5
25	Трамадол-М (O,N-дидезметил-)	Ас	57,1
26	Фенобарбитал-М(гидрокси-)	Ас	80,9
27	Хлорпромазин-М (гидрокси-)	Ас	90,4
Примечание: здесь и далее в таблицах, буква –М после названия вещества означает его метаболит.			

К 1 мл мочи добавляется 50 мкл раствора этилморфина г/х (0,02 г/л), 0,2 мл концентрированной соляной кислоты, флакон герметично закрывается и раствор нагревается на кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры к пробе добавляется 0,20 мл 30% раствора едкого натра и около 100 мг бикарбоната натрия до образования насыщенного раствора. Проверяется рН раствора по бумаге "Рифан" (рН должно быть 8,4-8,6), и объект экстрагируется 5 мл смеси хлороформ-изобутанол (6:1). Смесь встряхивается 5 минут для перемешивания и центрифугируется со скоростью 3000 об/мин. в течение 5 минут. Органический экстракт

пропускается через безводный сульфат натрия и испаряется в токе воздуха досуха при температуре не выше 40°С.

2.3 Дериватизация

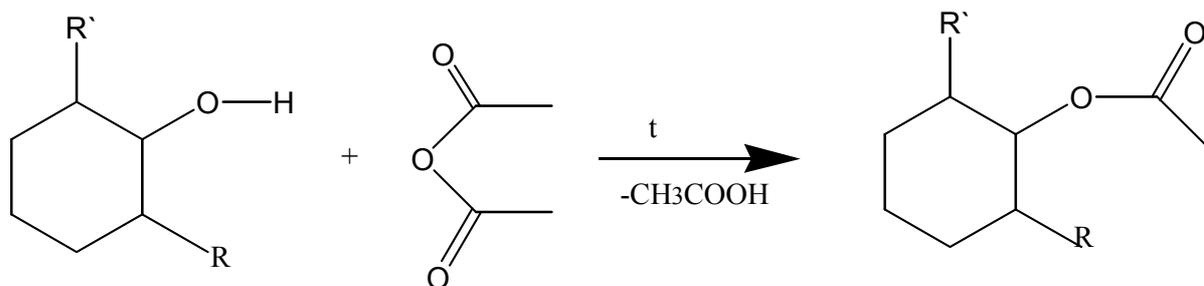
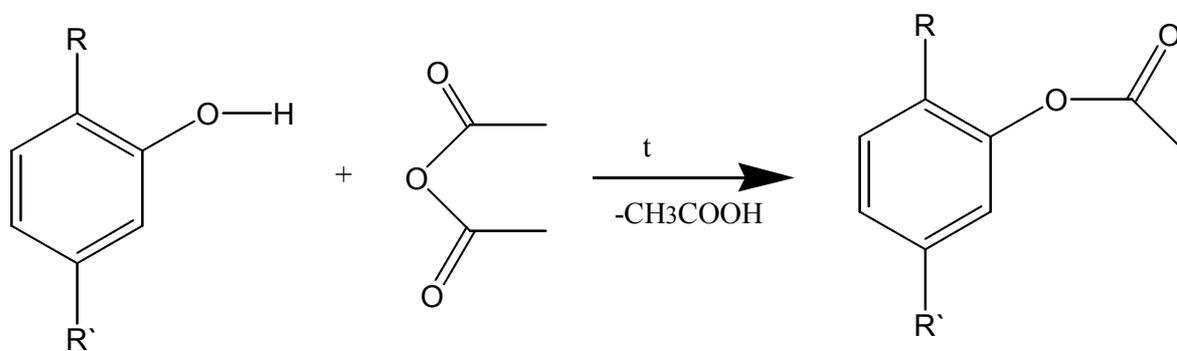
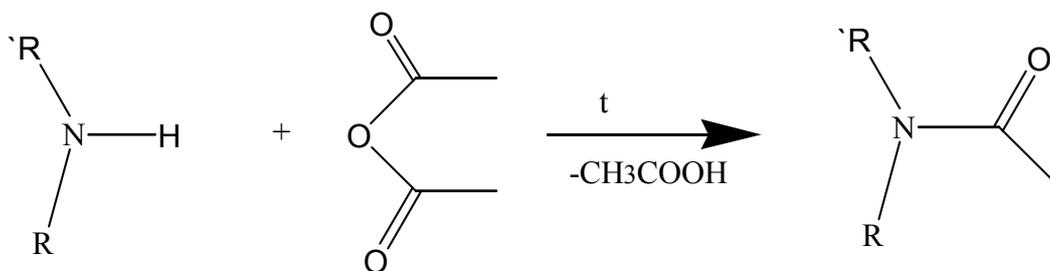
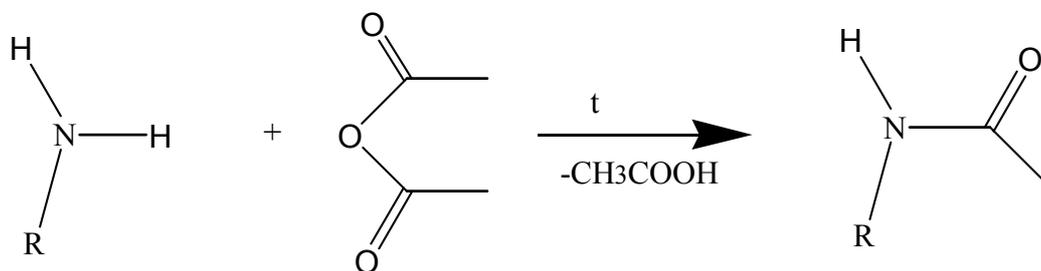
Стадия дериватизации необходима для анализа методом газовой хроматографии соединений, имеющих полярные группы -ОН и -NH. Чем больше полярных групп в соединении, тем менее оно летуче и тем меньше чувствительность и хуже воспроизводимость газохроматографического анализа без стадии дериватизации. Обычно метаболиты большинства лекарственных и наркотических веществ имеют одну или несколько полярных групп разной природы, это могут быть первичные и вторичные аминные группы H_2NR и $HNRR'$, имеющие основные свойства разной силы, фенольные или спиртовые гидроксигруппы -ОН, а также карбокси- и амидные группы, имеющие кислотные свойства разной силы. Поэтому для их анализа в моче после гидролиза необходима стадия дериватизации. Наиболее часто для анализа метаболитов применяется ацетилирование уксусным ангидридом в присутствии основного катализатора типа пиридина или триэтиламина. При ацетилировании происходит этерификация первичных и вторичных аминов, фенольных и спиртовых -ОН групп по схемам, приведенным на рис.2.8.

Ацетилирование наряду с безусловными преимуществами, такими как:

- дешевизна реактивов;
- стабильные дериваты с хорошими газохроматографическими свойствами;
- отсутствие эффекта “привыкания” колонки (как при анализе ТМС производных); обладает и некоторыми недостатками. Основным из них является возможность побочных реакций отнятия воды у некоторых соединений под действием сильного водоотнимающего средства -

уксусного ангидрида. Это приводит к тому, что из одного соединения с несколькими –ОН группами может образоваться несколько дериватов

Рис.2.8. Схемы ацетилирования аминов, фенольных и спиртовых гидроксильных групп.

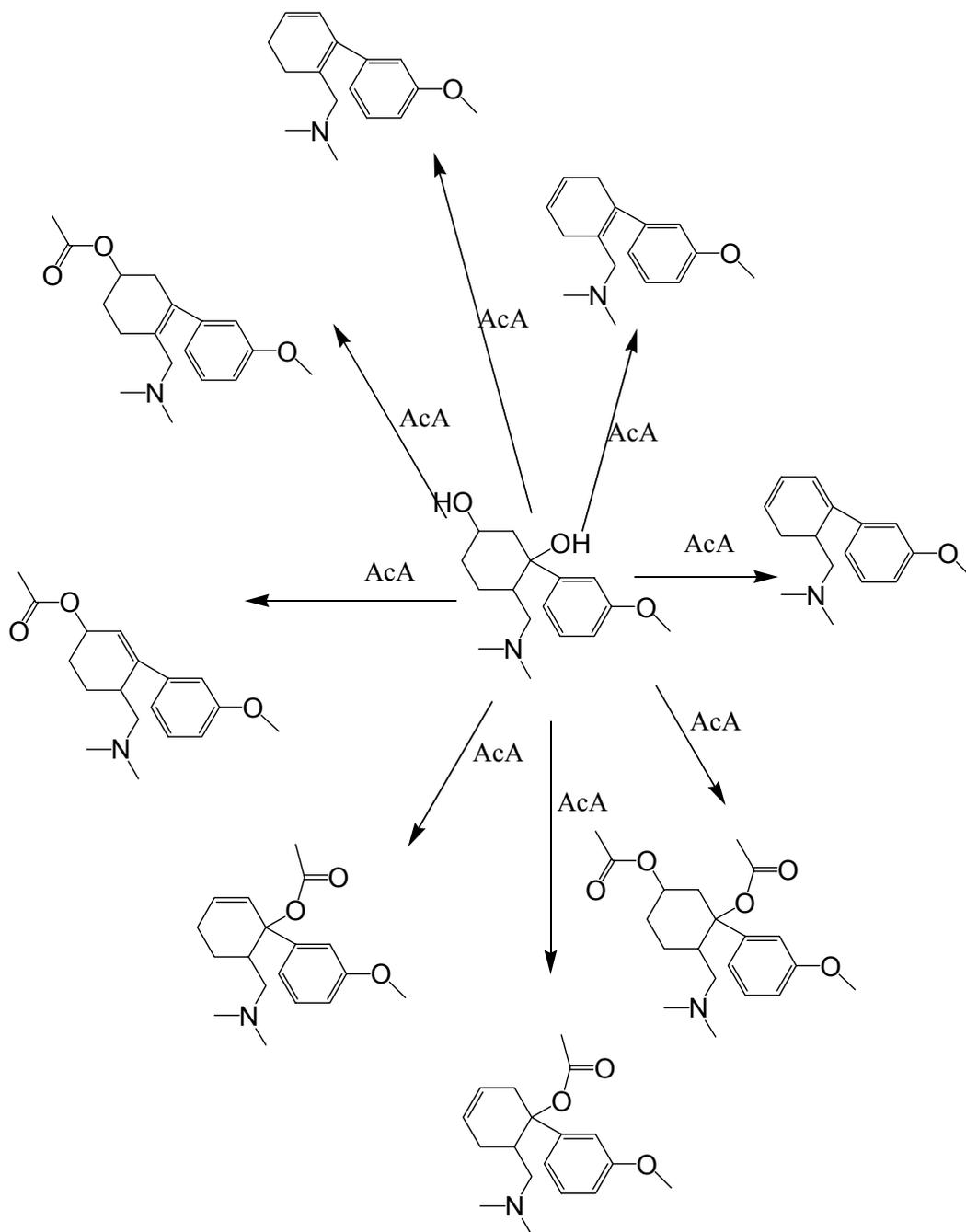


с непостоянным количеством продуктов реакции. Например, один из метаболитов трамадола (1-(3-метоксифенил)-2-(диметиламинометил)-гидроксициклогексан-1-ол) имеет структуру, изображенную на рис. 2.9. Этот метаболит имеет две -ОН группы в циклогексановом кольце и результатом реакции этого метаболита с уксусным ангидридом могут быть 8 соединений, структура которых изображена на рис. 2.9. Конечно, не все возможные продукты побочной реакции получают на практике в заметных количествах, тем не менее, при наличии большого количества метаболитов у одного соединения или при употреблении нескольких препаратов одновременно это явление существенно усложняет идентификацию и снижает чувствительность газохроматографического анализа. Возможность подобных реакций при ацетилировании необходимо учитывать при поиске и идентификации метаболитов лекарственных и наркотических веществ на хроматограмме. Другим недостатком ацетилирования является отсутствие реакции с NH- группами кислотного характера. Это не дает возможности закрытия полярных групп в барбитуратах и некоторых других соединениях, имеющих амидные группы. Обычно концентрации барбитуратов и других соединений кислотного характера в крови и моче даже при лекарственной дозировке достаточно велики, поэтому они легко обнаруживаются при скрининге без дериватизации.

Алкилирование (метилование, этилирование или пропилирование) обычно применяются для идентификации и количественного анализа веществ, имеющих NH- и OH- группы кислотного характера или карбоксильные группы [9,23,27,28], таких как барбитураты, каннабиноиды, диуретики и другие.

Триметилсилильные эфиры очень чувствительны к влаге и нестабильны при хранении, кроме того, введение реагентов для получения ТМС эфиров в колонку газового хроматографа при анализе ведет к ее «привыканию» и

Рис. 2.9. Схема возможных реакций, происходящих при ацетилировании 1-(3-метоксифенил)-2-(диметиламинометил)-гидроскиклогексан-1-ола (метаболита трамадола)



после этого резко ухудшаются газохроматографические характеристики колонки при анализе других дериватов и нативных лекарственных веществ. Однако, имея определенные навыки работы с триметилсилилирующими агентами и особенно при специализированных узконаправленных анализах, когда на приборе выполняются анализы только ТМС эфиров, с ними можно эффективно работать. Они в большинстве случаев имеют «хорошие» масс-спектры, что обеспечивает высокую чувствительность анализов.

Полифторированные реагенты (трифторуксусный, пентафторпропионовый и гептафтормасляный ангидриды) довольно дороги и также относительно легко гидролизуются, что ограничивает их применение, кроме того, для производных этих реагентов в библиотеках масс-спектров имеется очень мало справочных данных.

Следует также отметить, что избыток реагентов после ацетилирования (трифтор- пентафтор- и гептафторацетилирования) необходимо тщательно удалять, так как эти реагенты довольно реакционноспособны и могут повредить жидкую фазу колонки и металлические части масс – селективного детектора. Для целей скрининга мы используем ацетилирование смесью уксусного ангидрида с безводным пиридином, так как это один из самых простых и технологичных способов дериватизации, который не требует особых мер предосторожности и его преимущества для серийных массовых анализов, на наш взгляд, намного превосходят его недостатки.