

# Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2017

О. Н. Дворская<sup>1</sup>, И. П. Крохин<sup>2</sup>, С. С. Катаев<sup>2</sup>

## ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ В СКРИНИНГЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В КРОВИ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» МЗ РФ, Пермь, Россия.

<sup>2</sup> ГКУЗОТ «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы», Пермь, Россия.

На примере исследования 224 образцов крови показано, что использование методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в скрининге крови позволяет надежно идентифицировать широкий круг наркотических и лекарственных веществ, имеющих судебно-химическое значение, в том числе «дизайнерские» синтетические наркотики — метилendioксипировалерон (МДПВ), пирролидиновалерофенон (PVP) и их метаболиты; метаболиты каннабимиметиков *N*-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-пентил-1*H*-индазол-3-карбоксамид (AB-PINACA) и/или метилового эфира *N*-[(1-пентил-1*H*-индазол-3-ил)карбонил]валина (AMB). Для выявленных веществ приведено распределение по фракциям, рассчитаны значения констант диссоциации ( $pK_a$ ) и коэффициентов распределения в системе октанол — вода ( $\log P$ ).

**Ключевые слова:** метилendioксипировалерон; пирролидиновалерофенон; скрининг наркотических веществ; каннабимиметики; кровь; твердофазная экстракция.

Для надёжной идентификации лекарственных и наркотических веществ в аналитической и судебной токсикологии особое значение имеет качественная пробоподготовка, обеспечивающая высокую селективность и чувствительность применяемого в дальнейшем инструментального метода анализа. Процесс подготовки проб является наиболее трудоёмкой и сложной стадией анализа образцов. При этом в большинстве случаев в экспертной практике на начальной стадии исследования с целью выявления токсикантов используется скрининг.

Одним из перспективных вариантов пробоподготовки биологических образцов в практике судебно-химического и химико-токсикологического анализа заслуженно рассматривается метод твердофазной экстракции (ТФЭ). Метод ТФЭ появился в конце 70-х гг. прошлого столетия и на сегодняшний день широко используется, о чем свидетельствует диаграмма динамики роста упоминания метода в периодической медицинской литературе по данным ресурса PubMed (рис. 1) [1].

В то же время в литературе применение ТФЭ в широком понимании скрининга для лекарственных и наркотических веществ описано недостаточно. Имеющиеся работы по данной тематике посвящены, как правило, частным исследованиям на индивидуальные соединения или ограниченные группы соединений и не затрагивают при этом тенденций к оптимизации условий ТФЭ для максимального расширения возмож-

ности ее применения в скрининге лекарственных и наркотических веществ.

Результаты наших предварительных исследований показали, что применение для пробоподготовки крови патронов «SampliQ Evidex» на основе «зернистых» сорбентов со смешанной фазой позволяет проводить скрининг на вещества кислотного и основного характера с широким диапазоном липофильности [2]. К преимуществам данного вида патронов относится возможность проведения фракционирования веществ (в зависимости от физико-химических свойств аналита).

Целью настоящего исследования было на примере 224 реальных образцов крови показать пригодность методики ТФЭ с целью идентификации широкого спектра лекарственных и наркотических веществ в скрининге крови.

Использование ТФЭ повышает чувствительность метода исследования за счет высокой эффективности экстракции целевых соединений и способствует низкому фону сопутствующих веществ матрицы в конечной пробе образца. Унификация процедур ТФЭ при соблюдении протокола экстракции позволяет получать хорошо воспроизводимые результаты как внутри лаборатории [3], так и между лабораториями. Основными преимуществами ТФЭ в сравнении с жидкость-жидкостной экстракцией (ЖЖЭ) являются: сокращение времени анализа, уменьшение необходимых манипуляций, снижение стоимости, уменьшение расхода органических растворителей. ТФЭ при использовании в

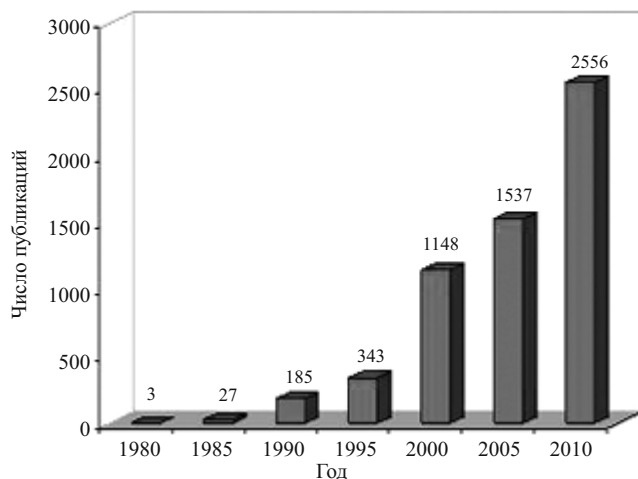


Рис. 1. Упоминание метода ТФЭ в периодической медицинской литературе [1].

скрининге в большинстве случаев обеспечивает более высокую эффективность экстракции, чем ЖЖЭ.

Учитывая, что в практике судебно-химических исследований наиболее распространенным и значимым объектом анализа является кровь, исследование проводили именно для нее. В соответствии с приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации № 346н “Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации” кровь входит в комплекс биологических объектов, которые направляют на анализ при подозрении на отравление ядовитым веществом. Следует отметить, что кровь является одним из наиболее сложных объектов исследования, что обусловлено, прежде всего, наличием взаимодействий определяемых веществ с белками. При этом трупная кровь часто гемолизирована, нередко име-

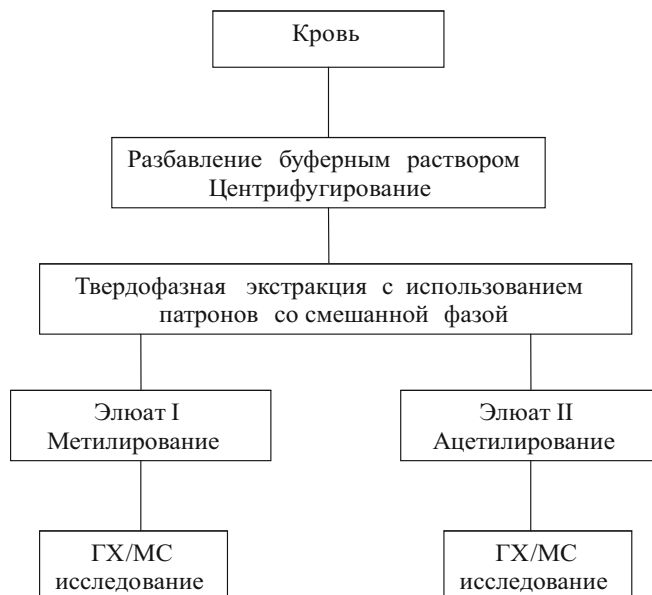


Рис. 2. Общая схема скринингового исследования крови на патронах SampliQ Evidex.

ют место гнилостные изменения, что также значительно усложняет процесс анализа. С этим связано ограниченное количество работ по применению ТФЭ в скрининге наркотических и лекарственных веществ для цельной крови [2, 4, 5] и в сыворотке [6].

#### Экспериментальная часть

Для ТФЭ применяли вакуумный коллектор (манифолд) на 12 позиций Visiprep™ SPE (Supelco, США), насос низкого вакуума AIR CADET (США). Для анализа использовали газовый хроматограф Agilent 7820 с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5975 (Agilent, США), колонка капиллярная HP-5MS, внут-

Таблица 1

#### Протокол ТФЭ для патронов “SampliQ Evidex”

Этап	Процедура
Подготовка образца	Во флакон вносили 0,5 мл крови, прибавляли по 20 мкл стандартов и 2 мл 1/15 М буферного раствора рН 4,8, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин, центрифугат отделяли от осадка
Кондиционирование	Через патрон пропускали 2 мл 95 % этанола, 2 мл 1/15 М буферного раствора рН 4,8
Загрузка образца	Со скоростью около 0,75 мл/мин
Промывка	Последовательно пропускали через патрон 1 мл 1/15 М буферного раствора рН 4,8 и 1 мл 10 % раствора этанола
Сушка	Сушка патрона проводилась под вакуумом в течение 20 мин
Элюирование 1	Дважды по 2 мл смеси <i>n</i> -гексан — этилацетат (3:1)
Элюирование 2	Дважды по 2 мл смеси дихлорметан — 2-пропанол — 25 % аммиак (4:1:0,1)
Элюаты I и II собирали по отдельности и испаряли в токе азота при температуре 40 °С до сухого остатка	
Дериватизация	Элюат I. К сухому остатку элюата I прибавляли 500 мкл безводного ацетона, 40 мкл йодистого метила и 20 – 25 мг безводного карбоната калия, флакон герметично закрывали и нагревали при 60 °С в течение 60 мин в термоблоке. Флакон охлаждали, отбирали жидкую фракцию реакционной смеси, переносили в чистый флакон и испаряли в токе азота при 40 °С. Сухой остаток растворяли в 100 мкл безводного этилацетата и 1 мкл вводили в испаритель ГХ/МС. Элюат II. К сухому остатку элюата II прибавляли 40 мкл безводного пиридина и 60 мкл уксусного ангидрида (омывали стенки флакона), флакон плотно закупоривали и обрабатывали микроволновым излучением в СВЧ-печи с мощностью 560 Вт в течение 5 мин. После охлаждения флакон вскрывали и выпаривали избыток реагентов в токе азота (при 40 °С). Сухой остаток растворяли в 100 мкл безводного этилацетата и 1 мкл вводили в испаритель ГХ/МС.

## Соединения кислотного характера

Соединение	pK <sub>a</sub>	log P	Элюат		Интервал найденных концентраций в крови, мг/л	Число случаев
			I	II		
Фенobarбитал	7,63; 12,3	1,67	+		0,07 – 29,7	34
Пентobarбитал	7,88; 12,6	2,05	+		...	5
Кеторолак	4,47	2,08	+		...	4
Кетопрофен	4,11	2,81	+		0,47	4
Тиопентал	7,78 10,3	2,99	+		...	6
Фуросемид	3,05; 9,80	3,00	+		...	2
Напроксен	4,4	3,0	+		7,0 – 7,2	7
Маркер АВ-PINACA*	3,40	3,17	+		...	1
Варфарин	4,5	3,42	+		...	5
Ибупрофен	4,41	3,72	+		0,3	5
Диклофенак	4,18	4,06	+		0,1	2

\* N-[(1-пентил-1*H*-индазол-3-ил)карбонил]валин — маркер каннабимиметиков АВ-PINACA [7] и AMB.

ренный диаметр 0,25 мм, длина 30 м, толщина пленки 0,25 мкм. Термоблок ПЭ-4030, одноканальный испаритель ПЭ-2300, микровстряхиватель ПЭ-2 (“Экрос”, Россия). Полуавтоматические пипетки-дозаторы Sartorius Biohit, позволяющие отбирать объемы жидкостей 4 – 40, 40 – 200 мкл и 0,2 – 1, 1 – 5 мл (Biohit, Финляндия). Центрифугирование образцов осуществляли на центрифуге ОПн-8 (ТНК “Дастан”, Кыргызстан). В качестве источника микроволнового излучения применяли бытовую микроволновую печь Rolsen MS1770SA (Россия).

В работе использовали патроны для ТФЭ SampliQ EVIDEX 200 мг/3 мл (Agilent, США). Все используемые растворители и реактивы градации были марки х.ч.: гексенал (ст. 333, ГФ X), гидрохлорид этилморфина (ст. 41, ГФ X), *N*-этилбензиламин (ICN, США); спиртовые растворы внутренних стандартов — гидрохлорида этилморфина (0,02 мг/мл) и *N*-этилбензиламина (0,01 мг/мл), гексенала (0,2 мг/мл). В качестве буферной системы использовали 1/15 М фосфатный буфер с величиной pH = 4,8.

Пробы крови до исследования хранились при +4 °С.

Описание этапов пробоподготовки приведены в табл. 1.

Образец вводили в испаритель ГХ/МС с использованием автосамплера. 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 за-

держкой включения 1 мин после ввода пробы); температура испарителя хроматографа и интерфейса детектора 250 и 280 °С соответственно; температура колонки: начальная 70 °С в течение 2 мин и прогрев до 280 °С со скоростью программирования 20 град/мин; выдержка при конечной температуре 14 мин; напряжение на умножителе масс-селективного детектора устанавливали на 200 В выше величины автоматической настройки детектора; регистрация масс-спектров в режиме полного сканирования ионов в интервале масс 45 – 450 а.е.

Обработку хроматограмм с целью идентификации компонентов проб проводили с использованием программ ChemStation G1701DA и AMDIS (The Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System, NIST).

Результаты расчетов физико-химических констант (log P, pK<sub>a</sub>) получены с использованием пакета программ ACD/Labs v6.0 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada).

## Результаты и их обсуждение

Схема исследования крови с использованием ТФЭ и ГХ-МС представлена на рис. 2.

Одной из важных процедур до этапа ТФЭ является разбавление образца крови буферным раствором, что приводит к снижению вязкости образца, корректирует величину pH среды, а также способствует смещению равновесия в системе связи аналита с белками крови.

Центрифугирование образца крови после разбавления позволяет удалить взвешенные частицы клеточных элементов крови и мембран эритроцитов, нивелируя таким образом мешающее влияние фрагментов клеток, способных блокировать фильтрующие материалы и/или сам сорбент патрона при пробоподготовке.

В качестве внутренних стандартов при скрининговых исследованиях крови нами были использованы гексенал, *N*-этилбензиламин, дионин как оптимальные, отвечающие требованиям к внутренним стандартам для веществ кислого и основного характера.

Таблица 3

## Соединения нейтрального характера

Соединение	pK <sub>a</sub>	log P	Элюат		Интервал найденных концентраций в крови, мг/л	Число случаев
			I	II		
Карбамазепин	-	2,6	+	+	1,85 – 4,6	11
Пиразинамид	-	-0,37	+		...	1

## Соединения основного характера

Соединение	pK <sub>a</sub>	log P	Элюат		Интервал найденных концентраций в крови, мг/л	Число случаев
			I	II		
Теобромин	0,49	-0,72	+	...	...	1
Кофеин	0,63	-0,13	+	+	...	141
Пентоксифиллин	0,66	0,32	+	...	...	1
Теофиллин	1,70	-0,17	+	...	...	4
Феназепам	1,74	3,30	+	...	...	3
Хлозепид	2,49	2,33	+	+	...	1
Метронидазол	2,58	-0,01	+	...	...	1
Диазепам	3,4	2,96	+	...	...	9
Никотинамид	3,54	-0,11	+	...	...	11
Изониазид	3,79	-0,89	+	19,3 – 22,9	...	5
Нифедипин	4,34	3,05	+	0,26	...	1
Котинин	4,72	-0,23	+	...	...	124
Тропикамид	5,32	1,15	+	...	...	7
Кветиапин	5,65; 3,45	1,57	+	28,5	...	1
Клозапин	6,19	3,48	+	4,8 – 13,2	...	2
Дротаверин	6,54	6,15	+	0,1 – 23,5	...	5
Анальгин-М1*	6,75	-0,40	+	...	...	25
Циннаризин	6,79; 2,35	4,63	+	0,5	...	7
Никотин	8,00; 3,21	0,72	+	...	...	95
Промедол	8,06	3,17	+	...	...	2
Анальгин-М2**	8,17	0,02	+	...	...	23
Кодеин	8,25	1,20	+	0,05 – 0,13	...	16
Морфин	8,26	0,43	+	0,07 – 0,19	...	12
МДПВ***	8,41	3,06	+	...	...	1
РVP****	8,49	3,65	+	...	...	1
Лидокаин	8,53	2,36	+	42,9	...	6
Доксиламин	8,68; 4,32	2,52	+	3,6 – 4,7	...	4
Амлодипин	8,75; 3,56	4,16	+	...	...	1
Димедрол	8,76	3,66	+	...	...	22
Дилтиазем	8,94	3,63	+	3,1 – 13,8	...	2
Толперизон	8,95	3,81	+	2,76	...	1
Пиридоксин	8,97; 2,45	-1,84	+	...	...	3
Хлоропирамин	9,0; 3,24	3,43	+	...	...	2
Хинин	9,05; 5,05	3,60	+	...	...	5
Метадон	9,05	4,20	+	...	...	2
Меторфинан	9,06	3,46	+	...	...	6
Хлорпротиксен	9,11	6,05	+	0,06 – 2,0	...	2
Меторфан	9,13	4,11	+	...	...	10
Пропранолол	9,15	3,1	+	4,2 – 54,9	...	3
Метопролол	9,18	1,79	+	2,26 – 36,1	...	6
Кетамин	9,21	1,82	+	6,22	...	7
Верапамил	9,23	5,06	+	6,5	...	1
Новокаин	9,24; 2,12	2,36	+	...	...	1
Амитриптилин	9,24	4,92	+	0,3 – 30,9	...	8
Аминазин	9,41	5,2	+	...	...	1
Кломипрамин	9,46	5,53	+	0,19	...	1
Сертралин	9,47	4,81	+	...	...	1
Трамадол	9,61	2,51	+	1,4 – 49	...	5
Метоклопрамид	9,62	2,22	+	...	...	3
Амфетамин	9,94	1,81	+	0,14	...	2
Атропин	9,98	1,53	+	...	...	24
Флуоксетин	10,06	4,09	+	...	...	2

\* Анальгин-М1 – 4-аминоантипирин, \*\* анальгин-М2 – 4-(N-метилано)антипирин, \*\*\* метилendioксипировалерон, \*\*\*\* пирролидино-валерофенон.

Перед использованием патронов с привитой фазой необходимо провести их кондиционирование (табл. 1). При этом процессе слой сорбента увлажняется растворителем, что обеспечивает необходимую степень упорядоченности привитой фазы для облегчения последующих взаимодействий с аналитом. Избыток сольватирующего агента (этанол) затем удаляется элюированием буферным раствором, который подготавливает слой сорбента к приему пробы.

Выбор вариантов дериватизации для элюатов I и II обусловлен прежде всего применяемым типом библиотеки масс-спектров по токсикологически значимым веществам и их метаболитам Pflieger-Mauer-Weber (MPW2011.L и более ранних версий), в которой основной упор сделан именно на ацетилированные и метилированные производные лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов.

Нами проведено исследование 214 образцов трупной крови и 10 образцов крови от живых лиц на наличие наркотических и лекарственных веществ с применением методики ТФЭ [2]. Данные выявленных соединений, их физико-химические характеристики и распределение по фракциям приведены в табл. 2 – 4. Значения константы диссоциации (pK<sub>a</sub>) и коэффициента распределения в системе октанол — вода (log P) рассчитаны с использованием программного обеспечения ACD/Lab версия 6.0 (Advanced Chemistry Development Inc., Торонто, Канада).

Для ряда веществ наблюдается распределение между элюатами I и II, обусловленное спецификой механизма удерживания на сорбенте и растворимостью в применяемых системах растворителей. Например, кофеин обнаруживается в обеих фракциях. Карбамазепин, являясь нейтральным веществом средней липофильности, идентифицируется в обоих элюатах, что связано с низкой растворимостью в системе растворителей гексан — этилацетат (3:1). Пиразинамид, являясь нейтральным гидрофильным веществом, идентифицируется в элюате II. Аналогично в элюате II определяются гидрофильные и низколипофильные вещества слабоосновного характера, такие как теофиллин, теобромин, изониазид, метронидазол, никотинамид, котинин, метаболиты анальгина. Последнее обусловлено их низкой растворимостью в системе растворителей гексан — этилацетат (3:1), то есть недостаточной элюирующей силой элюента.

Диазепам, феназепам, хлозепид, нифедипин представляют собой слабые основания с высокой липофильностью и определяются в элюате I, что обусловлено механизмом удерживания за счет гидрофобных сил и хорошей растворимостью в использованной системе для элюирования гексан — этилацетат (3:1).

Полученные данные согласуются с результатами нашего предварительного исследования о возможности применения ТФЭ с целью скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови [2], где использовали ряд модельных соединений с различными физико-химическими свойствами.

Практика применения нами методов ТФЭ и ГХ/МС для скрининга крови показывает, что данная схема исследования позволяет надежно идентифицировать широкий круг наркотических и лекарственных веществ, имеющих судебно-химическое значение. Использование сочетания данных методов также позволяет определять так называемые “дизайнерские” синтетические наркотики и их метаболиты (например, стимуляторы: метилendioксипиروвалерон, пирролидиновалерофенон и их метаболиты [8]; метаболиты каннабимиметиков *N*-[1-(аминокарбонил)-2-метилпропил]-1-пентил-1*H*-индазол-3-карбоксамид (АВ-РІНАСА) и/или метиловый эфир *N*-[(1-пентил-1*H*-индазол-3-ил)карбонил]-валина (АМВ).

Несмотря на несомненные достоинства методики скринингового исследования с использованием ТФЭ и ГХ/МС, следует отметить некоторые сложности. Так, более чем в половине исследований морфин не обнаружен, либо найден в следовых количествах. Также данная схема исследования ограничена чувствительностью к ряду соединений, например, моксонидину, тизанидину. Поэтому необходимы шаги по совершен-

ствованию предложенной схемы исследования по пути оптимизации условий выделения слабоосновных соединений, подбора элюирующей силы используемых смесей растворителей, а также вопросов, связанных с разрушением конъюгированных форм аналитов в крови перед их выделением с применением ТФЭ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
2. С. С. Катаев, О. Н. Дворская, *Суд.-мед. эксперт.*, **4**, 38 – 42 (2012).
3. Е. А. Крылова, С. С. Катаев, О. Н. Дворская, Ю. А. Хомов, *Бутлеров. сообщ.*, **9**, 61 – 70 (2013).
4. X.-H. Chen, J.-P. Franke, J. Wijsbeek and Rokus A. de Zeeuw, *J. Anal. Toxicol.*, **6**, 351 – 355 (1992).
5. X.-H. Chen, J.-P. Franke, J. Wijsbeek and Rokus A. de Zeeuw, *J. Chromatogr. Biomed. Applic.*, **1**, 147 – 151 (1993).
6. С.-К. Lai, Т. Lee, К.-М. Au and А. Y.-W Chan, *Clin. Chem.*, **2**, 312 – 325 (1997).
7. С. С. Катаев, Н. Б. Зеленина, О. Н. Дворская, *Бутлеров. сообщ.*, **9**, 131 – 138 (2013).
8. И. П. Крохин, С. С. Катаев, *Матер. межрегион. науч.-практ. конф.*, Екатеринбург (2012), сс. 59 – 62.

Поступила 31.08.14

## APPLICATION OF SOLID-PHASE EXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY WITH MASS-SPECTROMETRIC DETECTION IN THE SCREENING OF PHARMACEUTICAL AND NARCOTIC SUBSTANCES

O. N. Dvorskaya<sup>1</sup>, I. P. Krokhin<sup>2</sup>, and S. S. Kataev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, 614000 Russia

<sup>2</sup> Perm Regional Bureau of Forensic Medical Examination, Perm, 614002 Russia

Through case study of 224 blood samples showed that the use of solid-phase extraction methods and gas chromatography with mass-spectrometric detection (GC/MS) in blood screening allows one to reliably identify a wide range of pharmaceutical and narcotic substances having a forensic chemical significance, including “designer” synthetic drugs such as methylenedioxypropylvalerone (MDPV), pyrrolidinoverophenone (PVP), and their metabolites, as well as metabolites of cannabimimetics *N*-(1-carbamoyl-2-methylpropyl)-1-pentyl-1*H*-indazole-3-carboxamide (AB-PINACA) and/or methyl *N*-[(1-pentyl-1*H*-indazol-3-yl)carbonyl]valinate (AMV). The distribution of fractions for identified substances is given and the corresponding values of the dissociation constants ( $pK_a$ ) and partition coefficient ( $\log P$ ) in octanol/water system are calculated.

**Keywords:** methylenedioxypropylvalerone; pyrrolidinoverophenone; cannabimimetics; screening; pharmaceuticals; narcotic substances; blood; solid phase extraction; gas chromatography; mass spectrometry.