

**ДВОРСКАЯ ОКСАНА НИКОЛАЕВНА**

**НАУЧНО-МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СКРИНИНГУ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ  
ЖИДКОСТЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
доктора фармацевтических наук**

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный консультант:**

доктор химических наук **Григорьев Андрей Михайлович**

**Официальные оппоненты:**

**Шорманов Владимир Камбулатович** – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической, токсикологической и аналитической химии, профессор кафедры;

**Федосеева Людмила Михайловна** – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармации, профессор кафедры;

**Кобелева Татьяна Алексеевна** – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра химии, заведующий кафедрой.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск.

Защита диссертации состоится «29» октября 2019 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2, тел. (342) 233-55-01).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (614070, г. Пермь, ул. Крупской, 46) и на сайте (<http://www.pfa.ru>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы**

В экспертной практике при производстве судебно-химических и химико-токсикологических исследований особенно важным является наличие воспроизводимых, экономичных и реалистичных, с точки зрения имеющегося оборудования, методик пробоподготовки биологических объектов и последующего их анализа. При анализе сложных матриц стадия подготовки образца является наиболее трудоемкой и ответственной, она должна обеспечить необходимые условия чувствительности и чистоты для последующего инструментального анализа. При этом в большинстве случаев на начальной стадии исследования биологических объектов с целью выявления токсикантов необходим скрининг.

Из инструментальных методов, применяемых в скрининге широкого круга токсикологически значимых веществ, наибольшее распространение получил метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС). За счёт относительно невысокой стоимости и низких издержек на эксплуатацию оборудование для ГХ-МС включено в обязательный перечень приборной базы судебно-химических отделений бюро судебно-медицинской экспертизы, химико-токсикологических лабораторий наркологической службы и токсикологических центров. Важными элементами эффективного применения данного метода в работе лабораторных подразделений являются актуальные профильные масс-спектральные библиотеки и соответствующая пробоподготовка исследуемых образцов.

Одним из перспективных вариантов пробоподготовки биологических материалов в практике судебно-химического и химико-токсикологического анализа является твердофазная экстракция (ТФЭ), позволяющая за счет использования различных типов сорбентов осуществлять изолирование и/или очистку аналитов различной химической природы из биологических объектов. Однако, имеющиеся многочисленные работы зарубежных авторов посвященные, как правило, частным исследованиям индивидуальных соединений или ограниченных групп веществ, не затрагивают тенденций к оптимизации условий ТФЭ для максимального расширения возможности ее применения в скрининге лекарственных и наркотических веществ. Между тем, в практической деятельности эксперта предпочтительнее использование унифицированной методики с целью поиска широкого круга токсикантов, чем использование индивидуальных методик на каждое вещество.

Следует отметить, что в экспертной практике наиболее распространенным и значимым объектом анализа, наряду с мочой, является кровь. Однако ввиду специфических свойств крови (наличие форменных элементов, белковых веществ, возможность фибринолиза и гнилостных изменений посмертной крови) данный объект является наиболее сложным для анализа. Поэтому разработка методики скрининга токсикологически значимых веществ на примере крови с использованием ТФЭ является актуальной задачей токсикологического анализа.

Из токсикологически значимых веществ в последние годы большое распространение получили синтетические каннабимиметики и синтетические наркотические анальгетики производные фентанила, имеющие статус контролируемых

законодательством средств, что привело к необходимости их идентификации в биологических объектах от живых лиц и трупов. Характерной особенностью поведения этих веществ в организме человека является их практически полная биотрансформация, что свидетельствует о необходимости поиска их метаболитов. Следовательно, создание банка данных по биотрансформации и аналитическим характеристикам основных метаболитов психоактивных веществ с использованием эффективных способов пробоподготовки особенно актуально для целей судебно-химического и химико-токсикологического анализа.

### **Степень разработанности темы**

Ряд зарубежных авторов (Chen X.H, Wijsbeek J., Franke J.P, de Zeeuw R.A., Zweipfenning P.G. и др.) в 90-е годы 20-го века описали основную процедуру изолирования некоторых лекарственных и наркотических веществ, в основном, основного характера с использованием ТФЭ на патронах со смешанной фазой. Преимущественными объектами исследования были модельные смеси мочи, сыворотки и плазмы крови. Представленные работы, как правило, были направлены на исследование индивидуального вещества, либо на оптимизацию одного из показателей, например, чистоты полученного из биологического объекта экстракта. Chen X.H., Franke J.P., Ensing K., Wijsbeek J., de Zeeuw R.A. (1992, 1993, 1994), Zweipfenning P.G., Wilderink A.H.C.M., Horsthuis P. (1994), Bogusz M.J. с соавторами (1996) в ряде работ исследовали возможность автоматизации процесса ТФЭ, многократного использования патронов, сравнения воспроизводимости результатов анализа с использованием газовой хроматографии с различными видами детектирования, чистоту экстрактов и др. Однако комплексных исследований, охватывающие весь массив стадий ТФЭ в приложении к скринингу, не проводилось. В связи с этим разработка научно-методологических подходов для обоснования возможности использования ТФЭ как эффективного способа пробоподготовки биожидкостей, позволяющего на этапе скрининга определять широкий спектр токсикологически значимых веществ и их метаболитов, является в настоящее время одной из актуальных проблем судебно-химического и химико-токсикологического анализа и современной фармации в целом.

**Целью** настоящего исследования является разработка методологических подходов к скринингу лекарственных и наркотических веществ в биологических жидкостях с применением методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

### **Основные задачи исследования**

1. Разработать методику скрининга токсикологически значимых веществ в крови с применением ТФЭ и ГХ-МС при помощи модельных соединений.
2. Исследовать возможность применения разработанной методики для количественного определения ряда НПВС в процедуре скрининга крови.
3. Оценить эффективность экстракции патронов для ТФЭ со смешанной фазой ряда производителей для целей скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови.
4. Оценить эффективность применения разработанной методики в экспертной практике при исследовании крови от трупов и живых лиц.

5. Выявить основные метаболиты и предложить маркеры ряда новых синтетических каннабимиметиков (PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, AB-FUBINACA) в моче потребителей курительных смесей с использованием ТФЭ и ГХ-МС.

6. Сравнить различные варианты пробоподготовки мочи для совместного обнаружения метаболитов тетрагидроканнабинола и синтетических каннабимиметиков при варьировании способов деконъюгирования, экстракции и дериватизации.

7. Идентифицировать основные метаболиты синтетического наркотического анальгетика ацетилфентанила, выделяющиеся с мочой, и предложить маркеры, доказывающие факт его употребления, с использованием методов газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии.

8. Разработать научно-методологический подход к проведению скрининга лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов в биологическом материале на основе методов ТФЭ и ГХ-МС.

### **Методы исследования**

В качестве методов пробоподготовки биологических объектов (крови и мочи) использованы твердофазная и жидкость-жидкостная экстракция. Для анализа токсикологически значимых веществ и их метаболитов использованы газовая и жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием.

Для оптимизации процедуры ТФЭ использован метод математического планирования эксперимента с применением многофакторного 3-х уровневого моделирования Бокса-Бенкена. Для прогнозирования физико-химических свойств исследуемых соединений использован пакет программ "ACD/I-Lab service" (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada).

Математическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакетов прикладных программ STATISTICA 6.1 и MS Excel.

### **Научная новизна работы**

Разработана унифицированная методика скринингового исследования крови на основе комплекса научно-экспериментальных исследований с использованием ТФЭ и ГХ-МС.

Впервые выявлены основные метаболиты ряда синтетических каннабимиметиков PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, AB-FUBINACA в моче потребителей курительных смесей; предложены маркеры для установления факта их употребления; получены и описаны физико-химические, газохроматографические и масс-спектральные характеристики их дериватов; установлено, что основные метаболиты данных каннабимиметиков выводятся с мочой в конъюгированном виде;

Впервые идентифицированы основные метаболиты и предложены маркеры ацетилфентанила в образцах посмертной мочи; изучен метаболический профиль ацетилфентанила в моче, описаны основные пути его метаболизма; получены основные аналитические характеристики различных дериватов основных метаболитов ацетилфентанила.

Разработан научно-методологический подход к скринингу токсикологически значимых веществ с использованием ТФЭ на патронах со смешанной фазой и последующего анализа различных биологических объектов методом ГХ-МС.

**Теоретическая значимость** работы заключается в методологическом обосновании скрининга биологических объектов с применением твердофазной экстракции и ГХ-МС с целью определения широкого круга токсикологически значимых веществ. Сформулированный методологический подход к процедуре скрининга биологических жидкостей позволяет использовать его как для традиционных (жидкости, органы, ткани), так и для альтернативных (волосы, ногти) объектов судебно-химического и химико-токсикологического анализа.

В процессе изучения метаболизма нового наркотического анальгетика ацетилфентанила и синтетических каннабимиметиков группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов (PB-22, PB-22F, FUB-PB-22) и группы алкилиндазол-3-карбоксамидов, производных амида валина (AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, AB-FUBINACA) выявлены пути биотрансформации данных веществ, которые могут быть использованы для прогнозирования метаболизма их гомологов и аналогов, появляющихся в нелегальном обороте.

#### **Практическая значимость работы и внедрение результатов исследования**

Результаты диссертационного исследования апробированы и внедрены в практическую деятельность судебно-химических отделений и химико-токсикологических лабораторий Республики Беларусь и Казахстана, а также экспертных учреждений РФ гг. Санкт-Петербурга, Самары, Ярославля, Новосибирска, что подтверждено 14 Актами внедрения.

Приказом Председателя Государственного Комитета судебных экспертиз Республики Беларусь № 70 от 06.05.2017 г. методика скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови включена в Реестр судебно-экспертных методик и иных методических материалов ГК СЭ РБ.

Разработанный научно-методологический подход к скринингу лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов с использованием ТФЭ и ГХ-МС используется в химико-токсикологическом и судебно-химическом анализе биологических жидкостей с возможностью проведения серийной подготовки проб, что сокращает сроки проведения экспертных исследований при одновременном определении широкого круга токсикологически значимых веществ в одной пробе образца.

Материалы диссертационного исследования внедрены в учебный процесс при реализации программ специалитета по специальности 33.05.01 «Фармация», а также программ дополнительного профессионального образования по направлению подготовки «Фармацевтическая химия и фармакогнозия» и «Судебно-химический и химико-токсикологический анализ биологических объектов и вещественных доказательств».

По результатам исследования ФГБУ Российским центром судебно-медицинской экспертизы Минздрава России утверждены, выпущены и рекомендованы к использованию в судебно-химическом анализе 4 Информационных письма:

1. Идентификация метаболитов каннабимиметика PB-22 в моче : информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 12 декабря 2013 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, А. Б. Мелентьев. – 21 с.

2. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-PINACA в моче : информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 12 декабря 2013 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев. – 17 с.

3. Скрининг лекарственных и наркотических веществ, их метаболитов в крови с использованием твердофазной экстракции : информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 15 декабря 2015 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, И. П. Крохин. – 16 с.

4. Идентификация маркеров некоторых синтетических каннабиноидов в биологических объектах : информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 1 от 17 марта 2017 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, А.Б. Мелентьев. – 34 с.

Выпущена монография «Дизайнерские наркотики. Метаболизм и подходы к анализу в биологических средах», где обобщены известные данные о биотрансформации новых ПАВ и приведены собственные исследования о возможных путях метаболизма ацетилфентанила, идентификации и аналитических характеристиках его метаболитов, а также идентифицированных мочевых метаболитах синтетических каннабимиметиков группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов: РВ-22, РВ-22F, FUB-РВ-22 и группы алкилиндазол-3-карбоксамидов, производных амида валина: АВ-PINACA, 5F-АВ-PINACA, АВ-СНMINACA, АВ-FUBINACA. В монографии представлены современные способы пробоподготовки биообъектов, ТФЭ в частности, обеспечивающие извлечение аналитов для их последующего аналитического обнаружения, в том числе, с использованием собственных разработанных методик.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы доложены на следующих конференциях (2013 – 2018 гг.): I Международная научно-практическая конференция «Современная химико-токсикологическая экспертиза» I International scientific conference АСТЕ'2013, 6 – 7 октября 2013 г., г. Москва; II Научно-практический семинар «Методические и организационно-правовые проблемы деятельности химико-токсикологических лабораторий наркологической службы», 21 – 22 октября 2014 г., ФБГУ ННЦ наркологии Минздрава России, г. Москва; II Международная научно-практическая конференция «Современная химико-токсикологическая экспертиза» II International scientific conference АСТЕ'2015, 6 – 7 октября 2015 г., г. Москва; Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы судебной медицины», 5 – 6 октября 2016 г., г. Минск (на базе центрального аппарата Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь), РБ; VIII съезд врачей клинико-лабораторной службы Республики Беларусь, 10 – 11 ноября 2016 г., г. Минск, РБ; Четвертая научно-практическая конференция по клинической токсикологии Уральского федерального округа «Острые отравления. Токсикологические, наркологические и судебно-медицинские аспекты», 19 – 21 сентября 2018 г., г. Екатеринбург.

**Личный вклад автора.** Результаты, представленные в работе, получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Лично автором проведены сбор и анализ литературных данных, формирование плана диссертационного исследования, систематизация результатов, их анализ, написание статей, диссертации и автореферата.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа изложена на 373 страницах машинописного текста, содержит 148 рисунков и 48 таблиц, состоит из введения, обзора литературы (1 глава), экспериментальной части (4 главы), общих выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 424 источника, из них 353 иностранных, и 5 Приложений.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 30 печатных работ, в числе которых 1 монография, 16 работ в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов докторских диссертаций, из них 5 – в журналах, индексируемых реферативной базой SCOPUS.

**Связь задач с проблемным планом фармацевтических наук.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований Пермской государственной фармацевтической академии (номер государственной регистрации 01.9.50 007417).

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно п. 4 – разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Результаты теоретических и экспериментальных исследований по разработке методики скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови с использованием ТФЭ и ГХ-МС.

2. Результаты валидации методики количественного определения некоторых НПВС в крови при проведении процедуры скрининга.

3. Рекомендации по выбору оптимальных с позиций эффективности экстракции и экономической составляющей патронов для ТФЭ со смешанной фазой разных производителей.

4. Результаты экспериментального подтверждения эффективности разработанной методики, отражающие спектр выявленных лекарственных и наркотических веществ и их метаболитов в реальных образцах посмертной крови и крови от живых лиц.

5. Результаты использования ТФЭ и ГХ-МС для выявления основных метаболитов и маркеров синтетических каннабимиметиков РВ-22, РВ-22F, FUB-РВ-22, АВ-PINACA, 5F-АВ-PINACA, АВ-СНMINACA, АВ-FUBINACA в моче потребителей курительных смесей.

6. Результаты исследования нескольких методов пробоподготовки мочи с использованием различных вариантов гидролиза, экстракции и дериватизации для совместного выявления маркеров природных каннабиноидов и синтетических каннабимиметиков.

7. Метаболический профиль представителя наркотических анальгетиков ацетилфентанила в реальных образцах мочи, газохроматографические и масс-спектральные характеристики основных метаболитов и маркеров данного вещества, доказывающих факты его употребления.

8. Научно-методологический подход к проведению скрининга лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов в биологическом материале на основе методов ТФЭ и ГХ-МС.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Глава 1** представляет собой обзор литературных данных, в котором приведена характеристика метода твердофазной экстракции, основных ее стадий, области применения, преимущества использования; приведена классификация патронов и сорбентов для ТФЭ. Представлен обзор публикаций по проведению пробоподготовки методом ТФЭ биообъектов при определении различных токсикантов, контролируемых веществ, лекарственных препаратов и биологически активных веществ для целей химико-токсикологического и судебно-химического анализа, допинговых исследований и лекарственном мониторинге на этапах исследования кинетики потенциальных и используемых лекарственных препаратов. Отмечена направленность исследований на определение конкретного вещества или группы веществ (опиаты, барбитураты и др.), многообразие используемых фаз сорбентов для ТФЭ, множество разных элюентов, промывочных и буферных растворов, их различные объемы, сочетание с дополнительными видами очистки (иногда многостадийной) и т.п.

Приведено обоснование выбора объектов исследования, применяемого сорбента для ТФЭ, исходя из цели разработки скринингового, а не частного анализа. Отражено значение скрининговых исследований, особенно такого сложного объекта, как кровь, как наиболее востребованных в рутинном анализе биообъектов, что особенно актуально в связи с расширяющимся ассортиментом «дизайнерских наркотиков» в современных условиях рынка наркотических средств. Подчеркнута важность исследований, направленных на изучение биотрансформации новых психоактивных веществ в организме человека, получении аналитических характеристиках основных метаболитов с целью диагностики фактов их употребления. Приведена общая характеристика и известные данные о метаболизме исследуемых «дизайнерских наркотиков»: синтетического наркотического анальгетика ацетилфентанила и синтетических каннабимиметиков группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов (PB-22, PB-22F, FUB-PB-22) и алкилиндазол-3-карбоксамидов, производных амида валина (AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, AB-FUBINACA). Отмечена универсальность, надежность и возможность использования для скрининговых исследований метода газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием и актуальность этого оборудования для РФ.

**2 глава** включает в себя описание объектов и методов, используемых при проведении экспериментальных исследований; реактивы, растворители, используемые для проведения анализа; методики проведения пробоподготовки крови и мочи, варианты дериватизации, режимы работы приборов и программное обеспечение исследований.

В **3 главе** в рамках формирования общей методологии скрининга биологических объектов на широкий круг токсикантов с использованием ТФЭ и ГХ-МС изложены основные этапы исследований и приведены результаты эксперимента по разработке унифицированной методики скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови с использованием ТФЭ на сорбентах со смешанным типом фазы и ГХ-МС. Исследование

проведено на примере цельной и трупной крови, как наиболее сложной и важной матрицы в отношении судебно-химического и химико-токсикологического анализа.

**Выбор модельных соединений.** С целью прогнозирования поведения широкого круга токсикологически значимых соединений в процедуре ТФЭ, были проведены расчеты физико-химических характеристик: показателя константы диссоциации ( $pK_a$ ), коэффициента распределения октанол/вода и коэффициента адсорбции ( $K_{oc}$ ) для выбранных модельных соединений с различными показателями кислотности/основности и гидрофобности/гидрофильности при различных значениях pH. Определено, что оптимальный диапазон значения pH среды при выделении перечисленных веществ с учетом применяемого типа патронов для ТФЭ ожидаем в интервале от 3 до 6.

Для конкретизации pH и природы буферного раствора проведено **исследование эффективности экстракции (ЭЭ) модельных соединений при различных значениях pH** в диапазоне от 3 до 6 (таблицы 1 и 2).

Таблица 1 – Эффективность ТФЭ модельных соединений, определяемых в элюате I, на патронах SampliQ Evidex ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

pH*	Вещества кислотного и слабоосновного характера, % (RSD, %)			
	фенобарбитал	индометацин	диазепам	салициловая кислота
3,0	80,1 ( $\pm 0,3$ )	63,7 ( $\pm 1,9$ )	36,4 ( $\pm 5,0$ )	7,6 ( $\pm 0,9$ )
4,0	56,3 ( $\pm 18$ )	14,8 ( $\pm 18$ )	45,4 ( $\pm 32$ )	1,9 ( $\pm 63$ )
4,8	107,5 ( $\pm 4,4$ )	86,7 ( $\pm 7,1$ )	97,4 ( $\pm 3,4$ )	0,60 ( $\pm 6,6$ )
6,0	79,4 ( $\pm 0,7$ )	48,2 ( $\pm 9,2$ )	31,3 ( $\pm 8,9$ )	0

\* соответствует примененному буферному раствору (pH = 3 и pH = 4 – цитратные; pH = 4,8 и pH = 6 – фосфатные).

Таблица 2 – Эффективность ТФЭ модельных соединений, определяемые в элюате II, на патронах SampliQ Evidex ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

pH*	Вещества основного характера, % (RSD, %)			
	амфетамин	амитриптилин	изониазид	морфин
3,0	70,7 ( $\pm 13$ )	35,3 ( $\pm 20$ )	0	2,1 ( $\pm 9,4$ )
4,0	89,7 ( $\pm 11$ )	45,8 ( $\pm 3,5$ )	0,83 ( $\pm 89$ )	36,4 ( $\pm 25$ )
4,8	94,2 ( $\pm 8,4$ )	63,1 ( $\pm 7,2$ )	1,43 ( $\pm 20$ )	94 ( $\pm 9,9$ )
6,0	89,8 ( $\pm 0,6$ )	46,5 ( $\pm 4,3$ )	0,44 ( $\pm 87$ )	70,5 ( $\pm 4,0$ )

\* соответствует примененному буферному раствору (pH = 3 и pH = 4 – цитратные; pH = 4,8 и pH = 6 – фосфатные).

Из полученных результатов следует, что величина pH среды в интервале значений от 3 до 6 незначительно влияет на ЭЭ амфетамина и фенобарбитала. В тех же интервалах pH наблюдаются достаточные для надежной идентификации выходы амитриптилина (35–63 %), диазепама (31–97 %) и индометацина (14–87 %). Для морфина оптимальные результаты получены с фосфатным буфером при значениях pH, равных 4,8 и 6.

Максимальный выход салициловой кислоты наблюдается при величине pH = 3, что соответствует теоретическим предпосылкам. Для изониазида при величине pH = 4,8

наблюдается незначительный, но максимальный выход при минимальной величине относительного стандартного отклонения (RSD  $\pm 20$  %).

В процессе исследования отмечено, что использование цитратного буфера в процедуре ТФЭ проб крови, с последующей дериватизацией (путем ацетилирования) элюата II, приводит к «осмолению» пробы, что может иметь негативные последствия при дальнейшем анализе полученной пробы. Для уменьшения потерь слабоудерживаемых веществ в процессе ТФЭ на этапе промывки после загрузки образца использовались минимальные объемы (по 1 мл) промывочных растворов: фосфатный буфер и 10% этанол.

Проведено **сравнение эффективности ТФЭ** (с использованием фосфатного буфера рН = 4,8) **и жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ)** (для веществ кислотного характера при рН 2 хлороформом, для веществ основного характера при рН 9 смесью хлороформ-бутанол (6:1)) (таблица 3).

Таблица 3 – Сравнение эффективности ЖЖЭ и ТФЭ на патронах SampliQ Evidex модельных соединений

Соединение	Эффективность экстракции, % (RSD, %)	
	ЖЖЭ	ТФЭ*
Амфетамин	27,9 ( $\pm 32$ )	94,2 ( $\pm 8,4$ )
Изониазид	0,48 ( $\pm 173$ )**	1,43 ( $\pm 20$ )
Фенобарбитал	30,7 ( $\pm 10,1$ )	107,5 ( $\pm 4,4$ )
Амитриптилин	9,9 ( $\pm 5,8$ )	63,1 ( $\pm 7,2$ )
Диазепам	19,6 ( $\pm 4,5$ )	97,4 ( $\pm 3,4$ )
Морфин	44,9 ( $\pm 11,5$ )	94,0 ( $\pm 9,9$ )
Индометацин	3,2 ( $\pm 29,7$ )	86,7 ( $\pm 7,1$ )
Салициловая кислота	63,9 ( $\pm 7,9$ )	0,57 ( $\pm 6,6$ )

\*\* для варианта с применением буферного раствора рН = 4,8;

\*\*\* изониазид был определен в одном из трех параллельных образцов.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что метод ТФЭ с использованием ФБ рН = 4,8 для большинства модельных соединений имеет более высокие уровни значений ЭЭ в сравнении с методом ЖЖЭ (кроме салициловой кислоты). Низкая ЭЭ при изученных условиях наблюдается для гидрофильных веществ слабоосновного характера (изониазид). Таким образом, результаты предварительного исследования показали, что применение для пробоподготовки цельной крови патронов для ТФЭ SampliQ Evidex на основе сорбентов со смешанной фазой позволяет проводить скрининг крови на вещества кислотного и основного характера с широким диапазоном липофильности.

При этом следует учесть, что слабоосновные гидрофильные вещества и вещества кислотного характера со значением рK<sub>a</sub> ниже 3,8 (от гидрофильного до среднелипофильного характера) будут слабо удерживаться указанным сорбентом и их обнаружение в рассматриваемых условиях возможно только при значительных, то есть токсических и летальных концентрациях.

**Оптимизацию условий ТФЭ для скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови** проводили с использованием метода математического планирования эксперимента. Исследование ЭЭ (в качестве выбранного параметра оптимизации)

модельных соединений проводилось по схеме многофакторного 3-х уровневго плана Бокса-Бенкена. Для получения математической модели процесса ТФЭ были реализованы две повторности плана Бокса-Бенкена после его рандомизации (таблица 4).

Таблица 4 – Регулируемые факторы при проведении ТФЭ и уровни их варьирования

Фактор	Кодированные уровни		
	-1	0	+1
X1 – рН 1/15М фосфатный буфер, рН <sub>ФБ</sub>	4,8	5,4	6,0
X2 – объем буфера, V <sub>ФБ</sub> , мл	1	2	3
X3 – концентрация уксусной кислоты, C <sub>УК</sub> , моль/л	–	0,01	0,1
X4 – концентрация этанола, C <sub>Э</sub> , %	0	10	20
X5 – элюент I: гексан : этилацетат	2:1	3:1	4:1
X6 – концентрация метанола, C <sub>М</sub> , %	–	50	100
X7 – элюент II: метиленхлорид : 2-пропанол : 25% аммиак	2:1:0,1	3:1:0,1	4:1:0,1

«–» – этап отсутствует.

Для проверки качества аппроксимации уравнений регрессии были рассчитаны: коэффициент множественной корреляции  $r$ , коэффициент детерминации  $r^2$ , фактический критерий Фишера ( $F_{факт}$ ), уровень значимости критерия Фишера ( $p$ ) и стандартная ошибка (SS) (таблица 5).

Таблица 5 – Проверка адекватности и достоверности моделей регрессии для обоснования параметров проведения ТФЭ

Соединение	$r$	$F_{факт}$	$r^2$	$p$	SS
Основного характера $F_{табл} = 2,23$ ( $df1 = 7$ и $df2 = 54$ )					
Бензоилэргонин	0,714	8,00	0,5092	0,000	6,46
Диазепам	0,838	18,2	0,7025	0,000	22,3
Морфин	0,459	2,05	0,2103	0,065	33,0
Амитриптилин	0,315	0,850	0,0992	0,552	5,88
Амфетамин	0,427	1,72	0,1821	0,124	5,76
Кокаин	0,459	2,06	0,2108	0,064	8,36
Изониазид	0,237	0,458	0,0561	0,860	0,85
Кислотного характера $F_{табл} = 2,41$ ( $df1 = 5$ и $df2 = 56$ )					
Салициловая кислота	0,278	0,936	0,0772	0,465	1,24
Фенобарбитал	0,498	3,70	0,2484	0,006	17,8
Кеторолак	0,626	7,21	0,3917	0,000	12,1
Индометацин	0,430	2,54	0,1850	0,038	5,60

Значения коэффициентов множественной корреляции менее 0,3 для изониазид, салициловой кислоты указывают на отсутствие прямой связи между ЭЭ и рассмотренными факторами.  $r$ , вычисленный для моделей морфина, амитриптилина, амфетамина, кокаина, фенобарбитала и индометацина находится в диапазоне  $0,3 < r <$

0,5, что говорит о слабой прямой зависимости ЭЭ от изменений варьируемых в исследовании факторов.

Значение величины  $r$  для модели кеторолака в пределах  $+0,5 \leq r \leq +0,7$  соответствует прямой умеренной взаимосвязи, а для моделей бензоилэкгонин, диазепам определяется в интервале значений  $+0,7 < r < +1$ , что свидетельствует о прямой существенной (сильной) связи между результативным показателем ЭЭ и набором факторных показателей.

Коэффициент детерминации  $r^2$  показывает, какая доля вариации результативного показателя ( $\omega$ ) связана с вариацией факторных показателей. Чем ближе значение коэффициента к 1, тем сильнее зависимость, причем при  $r^2 > 0,5$  модель можно считать приемлемой. Как видно из таблицы 5,  $r^2$  для бензоилэкгонина и диазепама интерпретируются как хорошее соответствие модели полученным данным, что говорит о высокой точности аппроксимации.

Статистическую надежность множественной регрессии оценивали с помощью общего критерия Фишера ( $F$ -критерия), который проверяет нулевую гипотезу ( $H_0$ ) о статистической незначимости параметров регрессионных уравнений. Поскольку в регрессионном анализе для бензоилэкгонина, диазепама, фенобарбитала, кеторолака, индометацина  $F_{факт} > F_{табл}$ , то с вероятностью более 95% принимается гипотеза о том, что полученные значения не случайны и сформированы под влиянием существенных факторов. Таким образом, признается статистическая значимость регрессионных уравнений и их параметров для перечисленных модельных соединений.

Для морфина, амитриптилина, амфетамина, кокаина, изониазида, салициловой кислоты  $F_{таб} > F_{факт}$ . Это указывает на то, что полученные значения могли появиться случайно, т.е. сформироваться под влиянием несущественных факторов. Полученные коэффициенты регрессии ( $\beta$ ) для модельных соединений приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Множественная регрессия (линейная) для модельных соединений

Соединение	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$	$\beta_4$	$\beta_5$	$\beta_6$	$\beta_7$
Основного характера:							
Бензоилэкгонин	-0,17	-0,07	0,682*	-0,04	-0,01	-0,06	0,049
Диазепам	-0,05	0,050	0,808*	0,200*	0,013	0,028	0,007
Морфин	0,069	-0,03	-0,11	0,116	-0,01	-0,10	-0,41*
Амитриптилин	0,015	0,032	-0,06	0,249	0,010	-0,17	-0,09
Амфетамин	0,090	0,067	0,057	0,038	0,272*	-0,27*	0,122
Кокаин	0,047	-0,11	-0,09	0,193	0,034	-0,25*	-0,31*
Изониазид	0,023	-0,07	0,113	0,037	-0,16	0,091	0,070
Кислотного характера:							
Салициловая кислота	-0,03	-0,23	0,145	-0,01	0,011	-	-
Фенобарбитал	-0,16	-0,11	0,174	-0,41*	-0,02	-	-
Кеторолак	-0,19	-0,02	0,575*	-0,14	-0,05	-	-
Индометацин	-0,08	0,092	0,360*	0,165	-0,11	-	-

\* отмечены значения коэффициентов регрессии, вносящих наибольший вклад

- – этап отсутствует

Из приведенных данных (таблицы 5 и 6) следует, что для модельных соединений влияние большинства исследуемых факторов на ЭЭ отсутствует или оно не значительно. Выраженное влияние для некоторых соединений на ЭЭ имеют факторы X3 и X4.

Факторы и их сочетание, приводящие к наибольшим значениям полученных величин ЭЭ для исследуемых веществ, для наглядного представления изучаемых влияний и взаимодействий факторов представлены в виде различных диаграмм.

### Бензоилэкгонин

Из анализа полученной вследствие расчетов карты Парето (рисунок 1) следует, что изменение значений факторов X1 и X3 ведет к значимому влиянию на величину ЭЭ бензоилэкгонина. На рисунке 2 приведены поверхность отклика и контурная диаграмма зависимости ЭЭ бензоилэкгонина от факторов X1 и X3.

Из контурной диаграммы следует, что выраженное значение имеет фактор X3 и с увеличением концентрации уксусной кислоты растет ЭЭ бензоилэкгонина. Фактор X1 имеет меньшее влияние и имеет оптимальное значение показателя кислотности в диапазоне pH= 4,8 – 5,4.

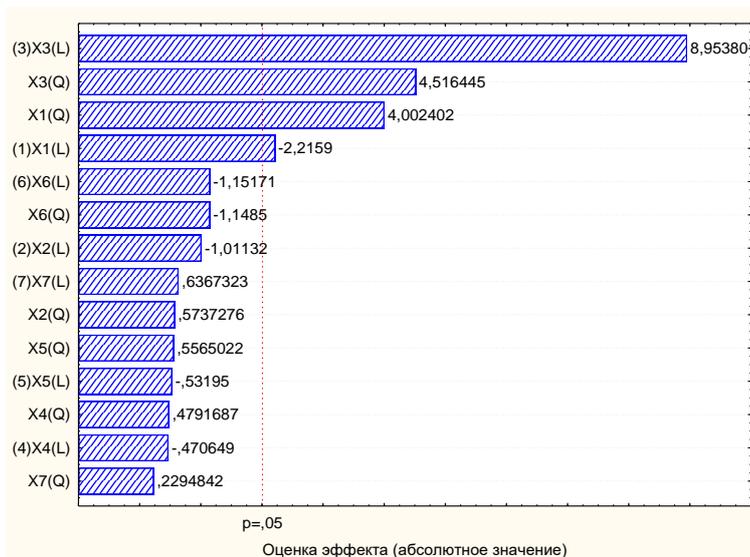


Рисунок 1 – Карта Парето стандартизованных эффектов для бензоилэкгонина

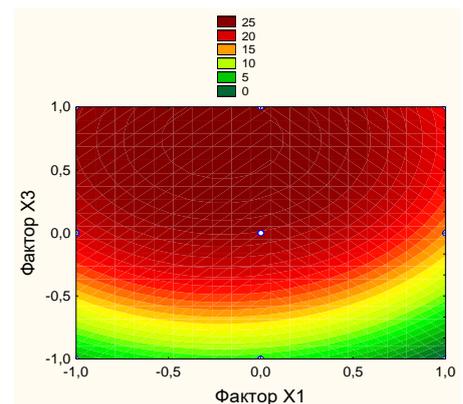
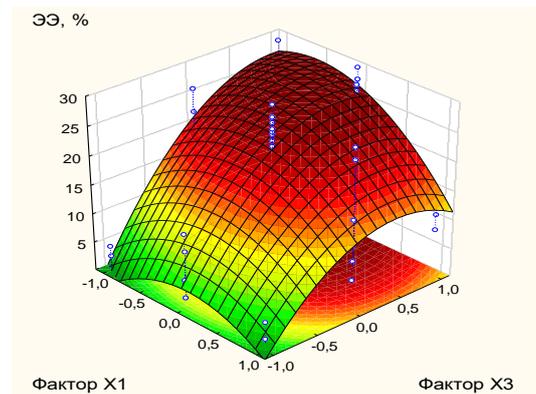


Рисунок 2 – Поверхность отклика (вверху) и контурная диаграмма (внизу) зависимости ЭЭ бензоилэкгонина от факторов X1 и X3

### Диазепам

Анализ карты Парето (рисунок 3) показал, что изменение значений факторов X3 и X4 ведет к значимому влиянию на величину ЭЭ диазепамом.

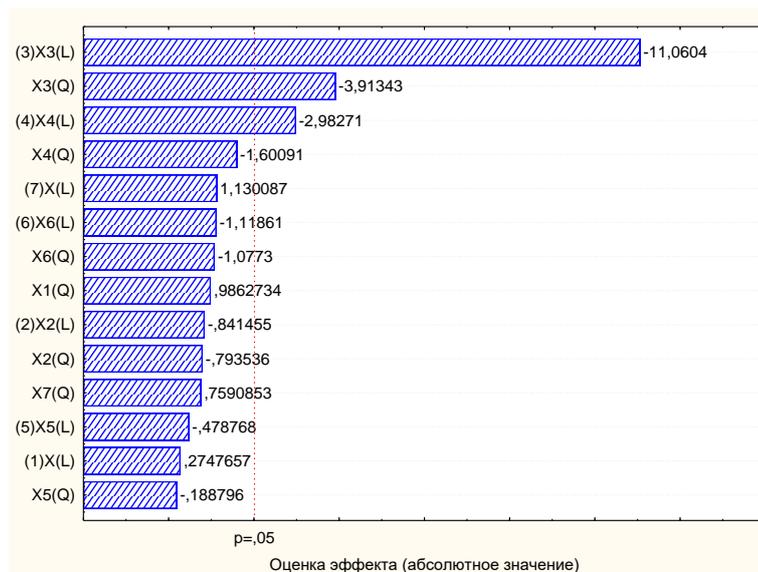


Рисунок 3 – Карта Парето стандартизованных эффектов для диазепама

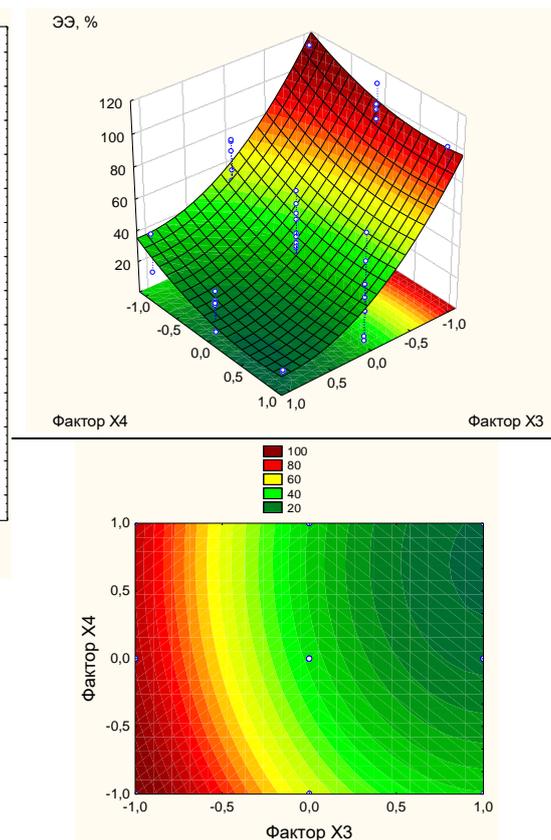


Рисунок 4 – Поверхность отклика (вверху) и контурная диаграмма (внизу) зависимости ЭЭ диазепама от факторов X3 и X4

Как следует из поверхности отклика и контурной диаграммы (рисунок 4), выраженное значение имеет фактор X3, и с увеличением концентрации уксусной кислоты ЭЭ диазепама для элюента I резко снижается, при этом растет ЭЭ диазепама для элюента II. Применение уксусной кислоты для промывки патронов приводит к перераспределению диазепама между элюатами I и II. Фактор X4 имеет меньшее влияние и с ростом концентрации этанола в растворе для промывки сорбента наблюдается снижение ЭЭ диазепама.

### Морфин

В соответствии с полученной картой Парето (рисунок 5), изменение значения фактора X7 значительно влияет на величину ЭЭ морфина. Отмечено, что результаты оценки регрессии показали высокие значения стандартной ошибки (33 %) для модели морфина. Последнее является следствием наличия фактора или факторов, которые выбранной моделью не учитываются, но влияют на оценку адекватности и достоверности модели.

На рисунке 6 приведена диаграмма маргинальных средних с доверительными интервалами зависимости ЭЭ морфина от фактора X7, из которой видно, что увеличение полярности элюента II (фактор X7) ведет к возрастанию ЭЭ морфина. Аналогичное влияние полярности элюента II нами наблюдалось при изучении ТФЭ золпидема и его метаболитов.

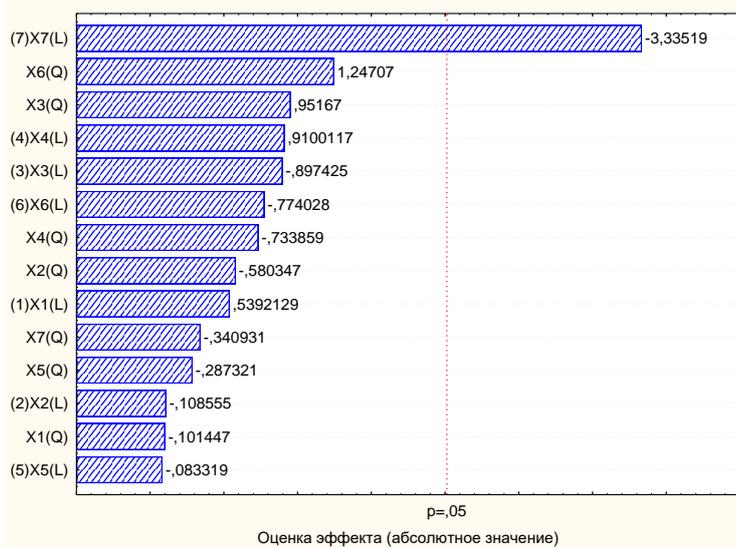


Рисунок 5 – Карта Парето стандартизованных эффектов для морфина

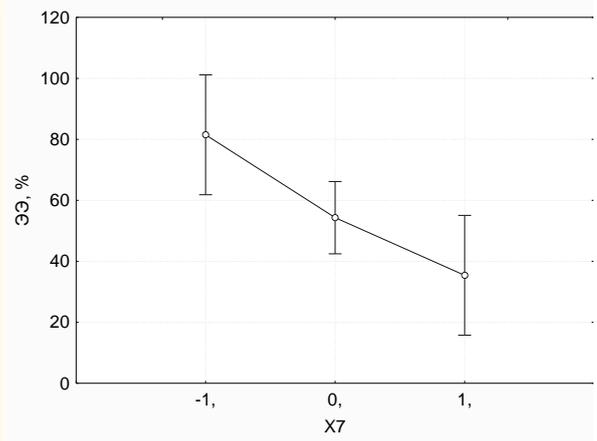


Рисунок 6 – Диаграмма маргинальных средних и доверительных интервалов зависимости ЭЭ морфина от фактора X7

### Фенобарбитал

Из анализа полученной карты Парето (рисунок 7) следует, что изменение значений факторов X4 (линейная зависимость) и X1 (квадратичная зависимость) ведет к значимому влиянию на величину ЭЭ фенобарбитала.

На рисунке 8 приведена диаграмма маргинальных средних с доверительными интервалами зависимости ЭЭ фенобарбитала от фактора X4. Из диаграммы видно, что снижение концентрации этанола (фактор X4) ведет к возрастанию ЭЭ фенобарбитала. Поверхность отклика и контурная диаграмма зависимости ЭЭ фенобарбитала от факторов X1 и X4 приведена на рисунке 9.

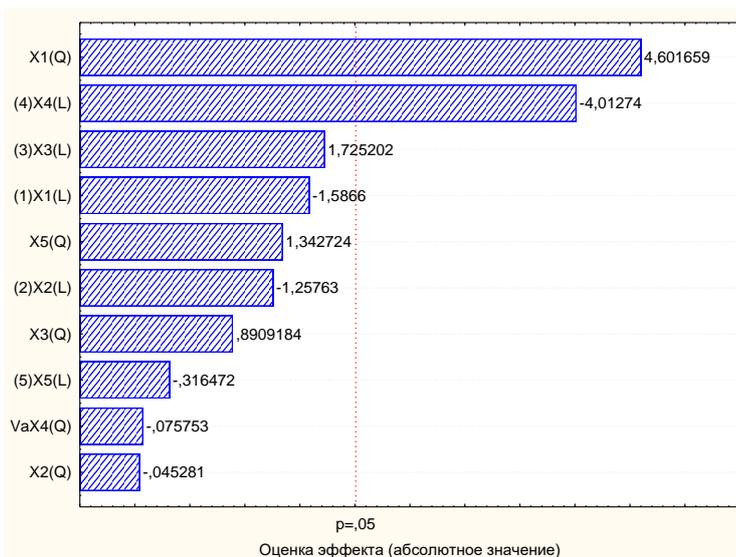


Рисунок 7 – Карта Парето стандартизованных эффектов для фенобарбитала

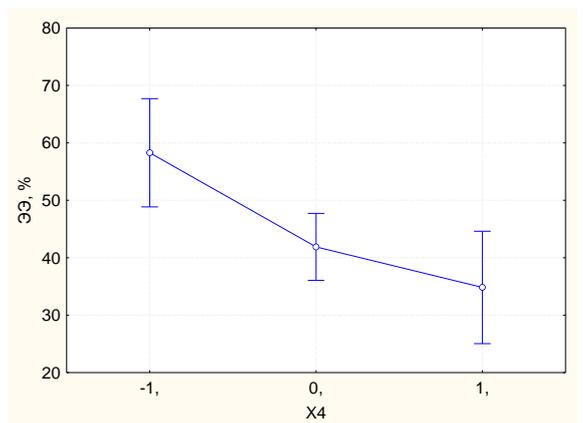


Рисунок 8 – Диаграмма маргинальных средних и доверительных интервалов зависимости ЭЭ фенобарбитала от фактора X4

Как видно из рисунка 9, наибольшее влияние имеет фактор X4, так, с увеличением концентрации этанола в растворе для промывки сорбента ЭЭ фенобарбитала снижается.

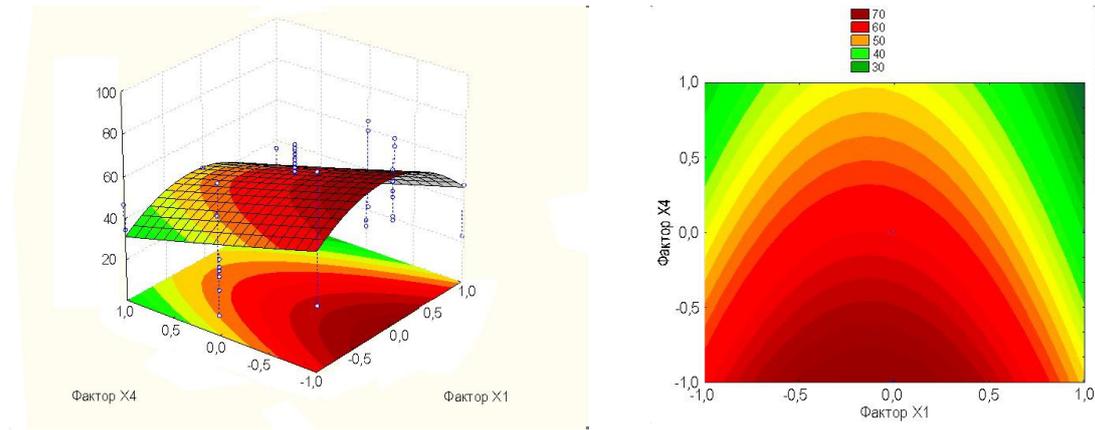


Рис. 9. Поверхность отклика (слева) и контурная диаграмма (справа) зависимости ЭЭ фенобарбитала от факторов X1 и X4

Фактор X3 дает незначительное увеличение ЭЭ фенобарбитала с ростом концентрации уксусной кислоты в растворе для промывки.

### Кеторолак

В соответствии с полученной картой Парето (рисунок 10) – изменение значения факторов X3 и X1 значительно влияет на величину ЭЭ кеторолака.

Поверхность отклика и контурная диаграмма зависимости ЭЭ кеторолака от факторов X1 и X3 приведена на рисунке 11. Фактор X3 показал значительное увеличение ЭЭ кеторолака с ростом концентрации уксусной кислоты в растворе для промывки. Так же некоторое влияние на ЭЭ кеторолака имеет фактор X1, снижение величины pH в буферном растворе приводит к росту ЭЭ.

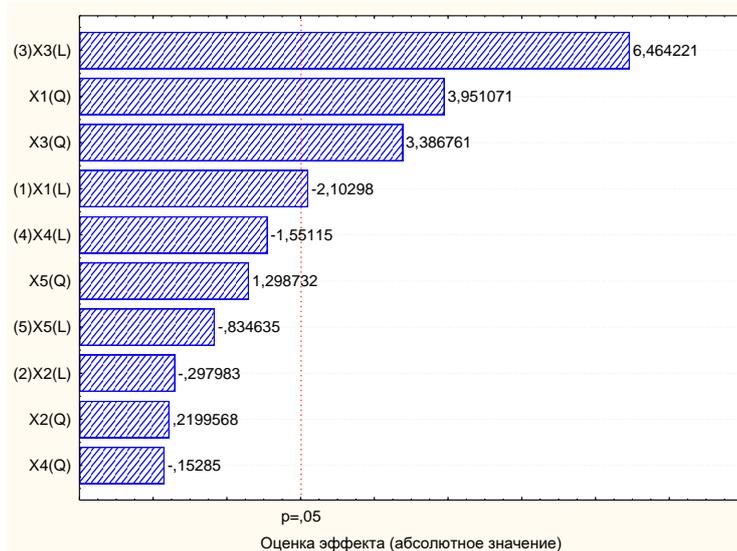


Рисунок 10 – Карта Парето стандартизованных эффектов для кеторолака

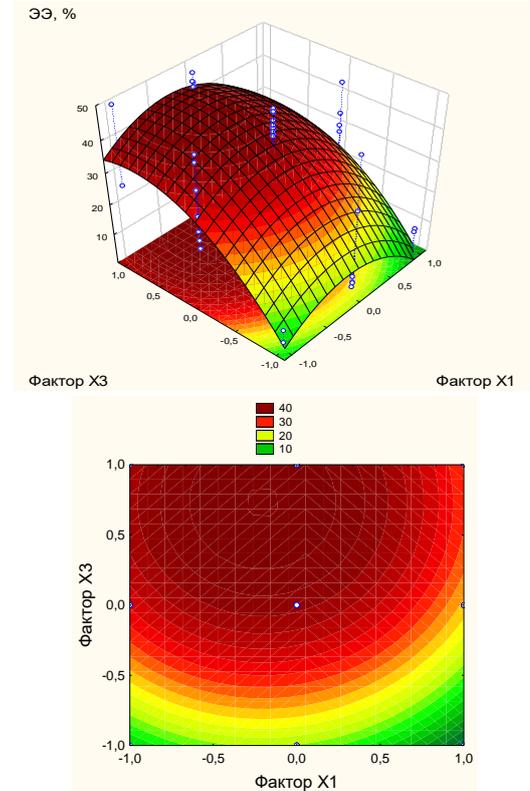


Рисунок 11 – Поверхность отклика и контурная диаграмма зависимости ЭЭ кеторолака от факторов X1 и X3

Рассмотренные факторы ТФЭ в пределах исследованных величин не имеют значимого влияния на ЭЭ амфетамина, амитриптилина, кокаина.

Наиболее выраженное влияние, согласно полученным данным, имеет фактор Х3 (использование раствора уксусной кислоты) для бензоилэргонина, диазепама, кеторолака. Наличие и концентрация УК подавляет ионизацию карбоксильных групп бензоилэргонина, кеторолака, что способствует увеличению их ЭЭ. Промывка раствором уксусной кислоты в качестве дополнительного этапа ведет к экстракционным потерям гидрофильных соединений (морфин, изониазид). Удаление указанного этапа для промывки патронов приводит к более полному извлечению диазепама в элюат I.

Влияние фактора Х4 выражено для фенобарбитала и диазепама, увеличение концентрации этанола на стадии промывки приводит к значительному снижению их ЭЭ.

В данном исследовании не выявлено связи фактора Х5 (изменение полярности элюента I) с ЭЭ модельных соединений. В то же время изучение ТФЭ некоторых нестероидных противовоспалительных средств (НПВС): кетопрофена, ибупрофена, кеторолака, напроксена, диклофенака, индометацина показало, что увеличение полярности элюента I ведет к росту ЭЭ НПВС.

Поведение салициловой кислоты и изониазида в процессе ТФЭ указывает на то, что в исследованных условиях ЭЭ определяется не характером факторов, а вероятно, градиентом концентрации указанных соединений в биологическом материале.

Эргонин в указанных условиях вариации факторов и с используемым типом патронов не определяется. Последнее следует учитывать при выборе метода исследования, если известно, что анализируемые вещества имеют высоко гидрофильный характер.

В результате, факторы Х3 и Х6 исключены из стадии пробоподготовки, фактор Х1 выбран при значении рН=4,8, объем промывки буферным раствором минимизирован и увеличена полярность элюентов I и II (факторы Х5 и Х7). В таблице 7 приведены рекомендуемые значения факторов.

Таблица 7 – Рекомендуемые условия скрининга после оптимизации

Фактор	Рекомендуемое значение
X1 – рН 1/15М фосфатный буфер, рН	4,8
X2 – объем буфера, мл	1
X3 – концентрация уксусной кислоты, моль/л	–
X4 – концентрация этанола, %	10
X5 – элюент I, смесь гексан : этилацетат	2:1
X6 – концентрация метанола, %	–
X7 – элюент II, смесь метиленхлорид : 2-пропанол : 25% аммиак	2:1:0,1

Таким образом, для эффективного извлечения из крови модельных соединений, обладающих различными физико-химическими свойствами, были оптимизированы все основные этапы проведения ТФЭ и получены искомые параметры влияющих на процесс экстракции факторов.

Проведено дополнительное **изучение влияния 0,1 М уксусной кислоты на этапе промывки в процедуре ТФЭ на эффективность экстракции** модельных соединений с использованием оптимизированной методики скрининга крови на лекарственные и наркотические вещества. Результаты сравнения ЭЭ модельных соединений из крови с использованием 0,1 М уксусной кислоты и без нее приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Эффективность ТФЭ модельных соединений с использованием 0,1 М уксусной кислоты и без, % (P = 0,95, n = 6, RSD, %)

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

н.д. – не детектируется

Как видно из полученных результатов, влияние использования 0,1 М раствора уксусной кислоты для салициловой кислоты, индометацина, фенобарбитала, амфетамина, изониазида, амитриптилина, кокаина отсутствует или оно незначительно и, соответственно, оно будет незначимо для других лекарственных и наркотических веществ, близких по физико-химическим свойствам к перечисленным модельным соединениям.

Для кеторолака и бензоилэкгонина применение стадии промывки уксусной кислотой ведет к росту ЭЭ; для кеторолака более чем на 40%, для бензоилэкгонина – на 20%. Увеличение ЭЭ для кеторолака обусловлено подавлением диссоциации карбоксильной группы, для бензоилэкгонина данный эффект можно объяснить подавлением образования цвиттер-иона.

Применение уксусной кислоты ведет к значительному снижению ЭЭ морфина, более чем на 60 %. В случае использования промывки с уксусной кислотой диазепам определяется в обоих элюатах, без данной стадии он полностью извлекается в элюат I. Распределение по элюатам для высоколипофильных и слабоосновных соединений, таких как 1,4-бензодиазепины, может вести к ухудшению чувствительности метода определения.

Таким образом, наблюдается разнонаправленная динамика влияния на ЭЭ для веществ с различными физико-химическими свойствами. С учетом того, что изложенный метод ТФЭ рассматривается как скрининговый, а также учитывая результаты

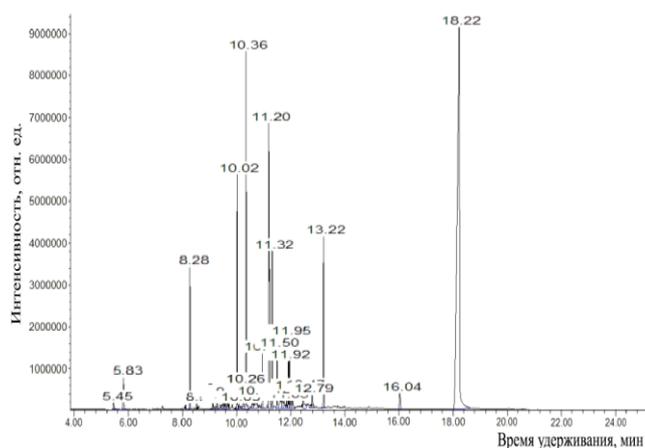
предварительных исследований с использованием математического моделирования Бокса-Бенкена, оптимальным его применение будет в варианте без использования стадии промывки 0,1 М раствором уксусной кислоты.

Проведено **количественное определение** часто встречающихся в биообъектах **нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) в процедуре скрининга крови** на лекарственные и наркотические вещества с целью оценки уровня концентрации (терапевтическая – токсическая доза).

Для количественного определения содержания ибупрофена, напроксена, кетопрофена, диклофенака, кеторолака, индометацина в крови применялась скрининговая методика, включающая ТФЭ НПВС из цельной крови на патронах со смешанной фазой и последующим анализом методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. В качестве внутреннего стандарта (ВС) использовался гексенал (как ВС в разработанной методике скрининга крови на лекарственные и наркотические вещества).

На рисунке 12 представлена хроматограмма модельной смеси метильных производных ряда НПВС (после дериватизации) в режиме полного сканирования ионов. В таблице 9 приведены времена удерживания метилированных НПВС и ВС, характеристические ионы, площадь которых использовалась для количественного определения, и соотношение сигнал/шум для нижней градуировочной точки.

Таблица 12 – Времена удерживания метилированных НПВС и гексенала (ВС), опорные характеристические ионы и соотношение сигнал/шум



Соединение	Время удерж., мин	Характеристический ион, m/z	Соотношение сигнал/шум
Гексенал (вн.ст.)	10,02	235	-
Ибупрофен	8,28	161	900 (8 мг/л)
Напроксен	10,89	185	211 (8 мг/л)
Кетопрофен	11,51	209	1600 (4 мг/л)
Диклофенак	11,91	214	2390 (4 мг/л)
Кеторолак	12,62	210	345 (4 мг/л)
Индометацин	16,05	139	439 (4 мг/л)

Рисунок 12 – ГХ-МС хроматограмма модельной смеси ряда метилированных НПВС

С целью оценки влияния элюента на эффективность экстракции НПВС в процедуре ТФЭ были использованы элюенты с различной степенью полярности: гексан – этилацетат (3:1); гексан – этилацетат (2:1); гексан – этилацет (1:1); этилацетат. Количественную оценку эффективности ТФЭ определяли по результатам исследования трех параллельных проб на двух уровнях концентрации НПВС.

Максимальный выход НПВС достигается при использовании в качестве элюента смеси гексан – этилацетат (2:1). Дальнейшее увеличение полярности элюента (гексан – этилацетат (1:1) и этилацетат) не приводит к значительному улучшению эффективности экстракции НПВС.

Самая низкая ЭЭ наблюдается у кеторолака, что ожидаемо, учитывая его низколипофильные свойства, и подтверждено экспериментальными данными. Таким образом, смесь гексан – этилацетат (2:1) рекомендована в качестве элюента в скрининге крови на наркотические и лекарственные вещества для выделения и идентификации НПВС на патронах со смешанной фазой.

При определении пригодности разработанных скрининговых условий количественного определения некоторых НПВС в цельной крови в соответствии с действующими руководствами, были определены следующие **валидационные параметры: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость).**

**Определение специфичности** методики проводили методом ГХ-МС. Для определения специфичности прибегли к сравнению масс-спектров пиков метиловых эфиров ибупрофена, напроксена, кетопрофена, диклофенака, кеторолака, индометацина с библиотечными спектрами метиловых эфиров соответствующих НПВС.

Также были построены хроматографические профили по трем основным характеристическим ионам метиловых эфиров рассматриваемых НПВС, доказывающие гомогенность хроматографических пиков для каждого НПВС, и соответствующей им бланковой крови.

Установлено, что в экстрактах бланковой крови отсутствуют хроматографические пики на месте выхода анализируемых НПВС, что свидетельствует о специфичности предложенной методики количественного определения НПВС.

Изучение **линейности** проводили на 5 количественных уровнях НПВС в крови: 4, 8, 16, 28, 40 мкг – для ибупрофена и напроксена, 2, 4, 8, 14, 20 мкг – для индометацина, кетопрофена, диклофенака и кеторолака (10 мкг гексенала в качестве ВС), критерий приемлемости – коэффициент корреляции не ниже 0,98. Для каждой из 5 концентраций ряда НПВС проводили исследование двух параллельных проб крови.

Построены калибровочные прямые, демонстрирующие зависимость отношения площадей пиков фрагментных ионов с соответствующими каждому НПВС величинами  $m/z$  и иона с  $m/z$  235 (гексенал) к концентрациям ибупрофена, напроксена, индометацина, кетопрофена, диклофенака и кеторолака. На основании полученных расчетных данных рассчитаны коэффициенты регрессионной прямой вида  $y = b \times x + a$  методом наименьших квадратов (таблица 13).

Таблица 13 Уравнения линейной регрессии коэффициентов корреляции для НПВС

НПВС	Уравнение линейной регрессии	Коэффициент корреляции, r
Ибупрофен	$y=0,2104x + 0,1622$	0,9874
Напроксен	$y=0,2176x - 0,0665$	0,9993
Кетопрофен	$y=0,1408x - 0,054$	0,9998
Диклофенак	$y=0,1121x + 0,0098$	0,9864
Кеторолак	$y=0,0302x + 0,0026$	0,9658
Индометацин	$y=0,2236x - 0,1037$	0,9998

На основании проведенных расчетов можно утверждать о соблюдении линейности выбранной методики для определения индометацина, кетопрофена, напроксена, ибупрофена и диклофенака в крови, т.к. коэффициент их корреляции равен 0,9864 – 0,9998. Линейность не соблюдается в случае определения кеторолака, коэффициент корреляции которого равен 0,9658.

**Правильность** выбранной методики хромато-масс-спектрометрического определения после ТФЭ НПВС в крови оценивали на всем диапазоне ее применения. Определение проводили с использованием модельных образцов крови с добавками НПВС в количестве 5 мкг, 20 мкг и 30 мкг (для ибупрофена, напроксена) и в количестве 2,5 мкг, 10 мкг и 15 мкг (для диклофенака, индометацина, кетопрофена, кеторолака).

Результаты, полученные для девяти определений для каждого образца (по три концентрации с трехкратным определением для каждой концентрации), представленные в таблице 14, подтвердили правильность валидируемой методики количественного определения НПВС.

Таблица 14 – Результаты количественного определения НПВС в образцах модельной крови для подтверждения правильности методики (P = 95 %, n = 3)

<b>диклофенак</b>									
Количество НПВС в образце, мкг	2,5			10			15		
Найденное количество, $x_{ср}$ , мкг	2,07			9,80			14,14		
$t_{выч.}$	1,73	1,15	1,15	0,92	1,07	1,99	0,81	1,96	1,15
<b>ибупрофен</b>									
Количество НПВС в образце, мкг	5			20			30		
Найденное количество, $x_{ср}$ , мкг	3,45			20,58			30,70		
$t_{выч.}$	1,15	1,82	1,97	0,69	1,97	1,28	0,29	1,86	1,57
<b>индометацин</b>									
Количество НПВС в образце, мкг	2,5			10			15		
Найденное количество, $x_{ср}$ , мкг	2,53			10,33			15,28		
$t_{выч.}$	1,44	0,29	1,73	1,17	0,07	1,77	0,95	1,99	0,95
<b>кетопрофен</b>									
Количество НПВС в образце, мкг	2,5			10			15		
Найденное количество, $x_{ср}$ , мкг	2,26			9,66			14,58		
$t_{выч.}$	1,73	1,15	0,58	1,97	0,94	1,02	1,46	2,00	0,53
<b>кеторолак</b>									
Количество НПВС в образце, мкг	2,5			10			15		
Найденное количество, $x_{ср}$ , мкг	2,88			11,93			17,93		
$t_{выч.}$	0,29	2,59	2,31	0,43	1,47	1,91	0,28	1,57	1,85
<b>напроксен</b>									
Количество НПВС в образце, мкг	5			20			30		
Найденное количество, $x_{ср}$ , мкг	4,63			19,16			29,18		
$t_{выч.}$	1,89	1,42	0,47	1,48	0,39	1,90	0,62	0,97	1,34
$t_{табл.}$	<b>4,30</b>								

Во всех случаях величина критерия приемлемости вычисленного критерия Стьюдента ( $t_{выч}$ ) находится в диапазоне от 0,2 до 2,59, что значительно ниже

табличного значения критерия Стьюдента, равного 4,30 (при заданной доверительной вероятности  $P = 95\%$  и числу степеней свободы  $f = n - 1$ ).

Для исследования **повторяемости** (сходимости) проанализированы 9 модельных образцов крови трижды для каждой концентрации НПВС (таблица 15). При этом пробоподготовка и анализ были проведены в один день, одним аналитиком и на одной и той же аппаратуре. Критерий приемлемости – коэффициент вариации должен быть не более 15%.

Таблица 15 – Результаты количественного определения НПВС в образцах модельной крови для подтверждения повторяемости методики ( $P = 95\%$ ,  $n=3$ )

<b>диклофенак</b>			
Количество НПВС в образце, мкг	2,5	10	15
Найденное количество, $x_{ср}$ , мкг	2,03	8,69	13,76
Стандартное отклонение, SD	0,08	0,11	0,23
Коэффициент вариации, RSD, %	4,03	1,29	1,63
<b>ибупрофен</b>			
Количество НПВС в образце, мкг	5	20	30
Найденное количество, $x_{ср}$ , мкг	3,66	17,85	34,53
Стандартное отклонение, SD	0,16	0,35	0,56
Коэффициент вариации, RSD, %	4,39	1,93	1,61
<b>индометацин</b>			
Количество НПВС в образце, мкг	2,5	10	15
Найденное количество, $x_{ср}$ , мкг	2,54	9,35	14,98
Стандартное отклонение, SD	0,1	0,21	0,26
Коэффициент вариации, RSD, %	4,04	2,27	1,76
<b>кетопрофен</b>			
Количество НПВС в образце, мкг	2,5	10	15
Найденное количество, $x_{ср}$ , мкг	2,38	9,22	14,39
Стандартное отклонение, SD	0,13	0,16	0,05
Коэффициент вариации, RSD, %	5,51	1,77	0,36
<b>кеторолак</b>			
Количество НПВС в образце, мкг	2,5	10	15
Найденное количество, $x_{ср}$ , мкг	2,62	9,80	13,22
Стандартное отклонение, SD	0,06	4,01	3,27
Коэффициент вариации, RSD, %	2,1	40,96	24,72
<b>напроксен</b>			
Количество НПВС в образце, мкг	5	20	30
Найденное количество, $x_{ср}$ , мкг	5,55	19,68	30,43
Стандартное отклонение, SD	0,14	0,68	0,17
Коэффициент вариации, RSD, %	2,52	3,43	0,55
<b>Коэффициент вариации, RSD, %</b>	<b>15%</b>		

Полученные результаты позволяют сделать вывод о подтверждении **прецизионности** выбранной методики на уровне **повторяемости** для диклофенака, ибупрофена, индометацина, кетопрофена и напроксена, т.к. коэффициент вариации при анализе проб крови с этими НПВС находится в пределах 0,36 – 5,51. При анализе модельных образцов крови, содержащих кеторолак, выявлено, что коэффициент

вариации больше 15%, что не подтверждает прецизионность выбранной методики на уровне повторяемости при анализе кеторолака в диапазоне выбранных концентраций.

Таким образом, доказана пригодность разработанной скрининговой методики количественного определения НПВС в цельной крови для кетопрофена, индометацина, напроксена, ибупрофена и диклофенака по параметрам специфичность, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость). Методика непригодна для количественного определения кеторолака по показателям линейность, правильность, прецизионность. Такой результат для кеторолака можно объяснить его несколько отличными от других рассмотренных НПВС физико-химическими свойствами и, как следствие, не оптимальными условиями пробоподготовки в рамках скрининговой методики.

С учетом коммерческой доступности различных патронов для ТФЭ на рынке хроматографической продукции и разнохарактерной информации исследователей о качестве и идентичности патронов разных производителей проведены исследования по сравнению эффективности экстракции лекарственных и наркотических веществ из крови для распространенных патронов со смешанной фазой некоторых торговых марок.

В таблице 16 приведены результаты оценки ЭЭ модельных соединений из крови на патронах для ТФЭ пяти известных брендов.

Полученные данные показали, что салициловая кислота не обнаружена в процедуре ТФЭ при использовании патронов Chromabond Drug (Macherey-Nagel). Низкая ЭЭ кеторолака с высокими значениями девиации наблюдалась для патронов Bond Elut Certify (Varian), Verify-CX (Thermo) и Chromabond Drug (Macherey-Nagel). Для бензоилэргонина и амитриптилина самая низкая ЭЭ отмечалась при использовании патронов EVIDEX SampliQ (Aqilent) и Verify-CX (Thermo).

Патроны Verify-CX (Thermo) по геометрическим параметрам несколько отличались от прочих исследованных патронов (имели объем 6 мл, а не 3, как остальные), последнее, в некоторой степени, могло повлиять на полученные результаты.

Следует отметить также следующее: при проведении процедуры ТФЭ для ряда образцов у некоторых патронов наблюдались затруднения при загрузке пробы, что, очевидно, связано с блокированием пор фритт. Такие затруднения имели место для патронов Bond Elut Certify (Varian), Chromabond Drug (Macherey-Nagel) и Strata Screen-C (Phenomenex), и не наблюдались для патронов 2 марок: EVIDEX SampliQ (Aqilent) и HyperSep Verify-CX (Thermo). Таким образом, при применении патронов Bond Elut Certify, Chromabond Drug и Strata Screen-C, следует обращать внимание на тщательность отбора центрифугата, избегая попадания взвеси и осадка при проведении процедуры ТФЭ.

Учитывая сложившуюся систему закупок, которая не позволяет гарантированно приобретать конкретный вид патронов для ТФЭ, необходимо обращать внимание на качество сорбентов, использованных в их производстве. В противном случае, «смыв» фазы может привести к химическому загрязнению элюатов, отсутствию воспроизводимости анализа и, как следствие, получению необъективных результатов исследования.

Таблица 16 – Результаты оценки эффективности экстракции модельных соединений (n = 6, RSD, %)

Соединение	Evidex SampliQ (Aqilent)		Strata Screen-C (Phenomenex)		Bond Elut Certify (Varian)		HyperSep Verify-CX (Thermo)		Chromabond Drug (Macherey-Nagel)	
	Элюат I	Элюат II	Элюат I	Элюат II	Элюат I	Элюат II	Элюат I	Элюат II	Элюат I	Элюат II
Салициловая кислота	0,82 (91)	н.о.	следы	н.о.	следы	н.о.	0,02 (90)	н.о.	н.о.	н.о.
Фенобарбитал	88 (8,6)	н.о.	81 (4,6)	н.о.	81 (3,5)	н.о.	79 (9,0)	н.о.	84 (2,6)	н.о.
Кеторолак	27 (13)	н.о.	30 (49)	н.о.	12 (90)	н.о.	7,0 (53)	н.о.	14 (98)	н.о.
Диазепам	61 (9,9)	н.о.	60 (23)	н.о.	55 (4,2)	0,91 (99)	60 (6,4)	2,4 (58)	68 (2,5)	1,7 (56)
Индометацин	101 (5,2)	н.о.	106 (3,6)	н.о.	97 (1,6)	н.о.	100 (4,0)	н.о.	105 (2,7)	н.о.
Экгонин	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Амфетамин	н.о.	93 (4,5)	н.о.	104 (20)	н.о.	98 (1,4)	н.о.	90 (12)	н.о.	97 (2,2)
Изониазид	н.о.	0,69 (33)	н.о.	1,1 (30)	н.о.	0,58 (36)	н.о.	0,79 (22)	н.о.	0,69 (23)
Бензоилэкгонин	н.о.	48 (9,5)	н.о.	78 (3,3)	н.о.	68 (15)	н.о.	38 (10)	н.о.	58 (24)
Амитриптилин	н.о.	53 (14)	н.о.	71 (26)	н.о.	82 (6,6)	н.о.	69 (14)	н.о.	90 (5,8)
Кокаин	н.о.	79 (6,4)	н.о.	84 (5,6)	н.о.	85 (4,3)	н.о.	78 (15)	н.о.	102 (1,6)
Морфин	н.о.	24 (19)	н.о.	9,1 (55)	н.о.	10 (40)	н.о.	6,1 (33)	н.о.	8,0 (20)

н.о. – не обнаружено.

Исходя из обобщенных результатов проведенных исследований, составлен алгоритм скрининга крови, включающий основные этапы исследования с использованием ТФЭ на патронах со смешанной фазой и ГХ-МС (рисунок 13). Протокол процедуры ТФЭ после оптимизации приведен в таблице 17.

Одной из важных процедур пробоподготовки до этапа ТФЭ является разбавление образца крови буферным раствором, что приводит к снижению вязкости образца, корректирует величину рН 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, снижая возможность блокировки фильтрующих элементов патрона при пробоподготовке.

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

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.



Рисунок 13– Алгоритм скринингового анализа крови с применением патронов SampliQ Evidex

Таблица 17 – Протокол процедуры твердофазной экстракции (после оптимизации)

Кондиционирование сорбента	Через патрон последовательно пропускают 2 мл 95 % этанола и 2 мл 0,067 М буфера фосфатного (рН 4,8)
Загрузка образца	Со скоростью 1 мл/мин
Промывка патрона	Через патрон со скоростью 2-3 мл/мин последовательно пропускают 1 мл 0,067 М буфера фосфатного (рН 4,8) и 1 мл 10 % этанола
Сушка патрона	Проводят под вакуумом в течение 20 мин
Получение элюата I	Элюируют дважды 2 мл смеси н-гексан – этилацетат (2:1)
Получение элюата II	Элюируют дважды 2 мл смеси метилхлорид – 2-пропанол – 25 % аммиак (2:1:0,1)

Предложенный алгоритм исследования был опробован на реальных образцах посмертной крови и крови от живых лиц, в результате чего было выявлено 111 лекарственных и наркотических веществ, а также их метаболитов, приведено распределение веществ по фракциям, для них рассчитаны основные физико-химические характеристики.

Практика применения 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 позволяет определять так называемые «дизайнерские» синтетические наркотики и их метаболиты (например, стимуляторы: метилendioксипировалерон, пирролидиновалерофенон и их метаболиты; 3-метил-2-(1-[5-фторпентил]-1Н-индазол-3-карбоксамидо)бутановая кислота (маркер АВ-PINACA и АМВ), 3,3-диметил-2-(1-[5-фторпентил]-1Н-индазол-3-карбоксамидо)бутановая кислота (маркер MDMB(N)-2201), 3-метил-2-[1-(4-фторбензил)-1Н-индазол-3-карбоксамидо]бутановая кислота (маркер АВ-FUBINACA), 3-метил-2-(1-фторпентил-1Н-индазол-3-карбоксамидо)бутановая кислота (5-F-AB-PINACA), 3-метил-2-[1-циклогексилметил-1Н-индазол-3-карбоксамидо]бутановая кислота (AB-CHMINACA), 5-[3-(3,3,4-триметилпент-4-еноил-1Н-индол-1-ил)]пентановая кислота (маркер 1 XLR-11) 5-[3-(4,4,5-триметил-4Н-пиран-2-ил)-1Н-индол-1-ил]пентановая кислота (маркер 2 XLR-11).

**Глава 4** посвящена выявлению основных метаболитов синтетических каннабимиметиков группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов PB-22, PB-22F, FUB-PB-22 и группы алкилиндол-3-карбоксамидов, производных амида валина АВ-PINACA, 5F-AB-PINACA, АВ-FUBINACA, АВ-CHMINACA в моче с использованием методов ТФЭ и ГХ-МС.

При исследовании реальных образцов мочи лиц, употреблявших курительные смеси (находящихся на лечении после интоксикации СК, либо доставленных для медицинского освидетельствования в состоянии одурманивания), с использованием методики скрининга крови на лекарственные и наркотические вещества (после соответствующей пробоподготовки мочи) идентифицированы основные метаболиты синтетических каннабимиметиков PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, АВ-PINACA, 5F-AB-PINACA, АВ-FUBINACA, АВ-CHMINACA. Представлены газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики некоторых производных основных метаболитов PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, АВ-PINACA, 5F-AB-PINACA, АВ-CHMINACA, АВ-FUBINACA, которые могут быть использованы для целей судебно-химического и химико-токсикологического анализа.

В процессе исследований установлено, что каннабимиметики PB-22, PB-22F и FUB-PB-22, содержащие в своей структуре сложноэфирную связь, подвергаются биотрансформации, главным образом, путем гидролиза сложного эфира с образованием ряда карбоксильных метаболитов и 8-гидроксихинолина, с последующим конъюгированием метаболитов, достигающим 100%. Все идентифицированные метаболиты PB-22, PB-22F и FUB-PB-22 были обнаружены в элюате I. В элюате II обнаруживали 8-гидроксихинолин.

Общая схема образования маркеров каннабимиметиков из индолкарбоксилатов представлена на рисунке 14.

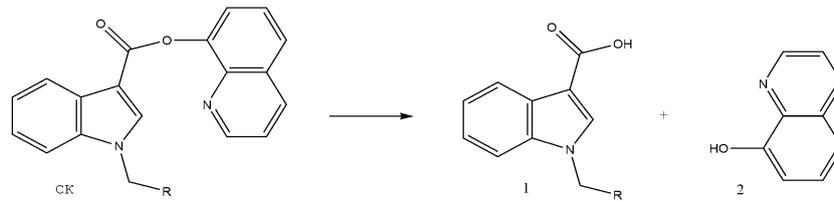


Рисунок 14 – Общая химическая структура каннабимиметиков РВ-22 (R = н-бутил), РВ-22F (R = 4-фтор-н-бутил), FUB-РВ-22 (R = 4-фторфенил), их маркеров: метаболит М1 (соединение 1 – кислотный маркер) и 8-гидроксихинолина (соединение 2 – спиртовой маркер).

На примере одного из рассматриваемых СК, на рисунке 15 приведены структурные формулы каннабимиметика РВ-22F и его метаболитов, идентифицированных нами при исследовании образцов мочи лиц, употреблявших курительные смеси.

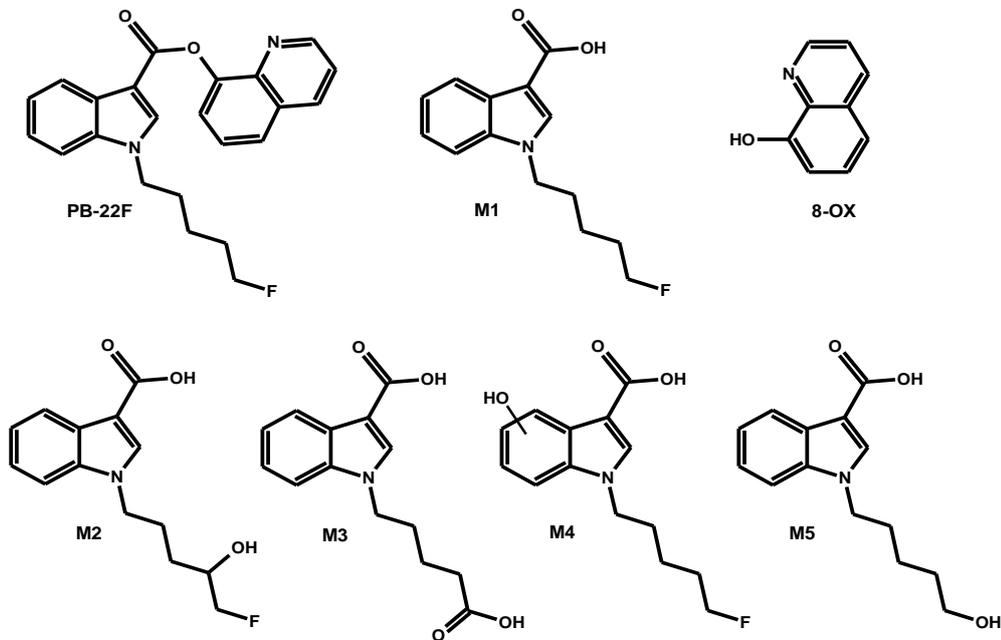


Рисунок 15 – Структурные формулы каннабимиметика РВ-22F и его предполагаемых метаболитов

Кроме основного направления биотрансформации, связанного с гидролизом сложного эфира, наблюдаются процессы гидроксирования, окислительного дефторирования и последующего окисления, которые идут не столь интенсивно. Вторым этапом метаболизма является конъюгирование карбоксильных и гидроксильных метаболитов с последующим выведением их с мочой. Применение для определения метаболитов индолкарбоксилатов в моче метода ГХ-МС требует проведения гидролиза конъюгированных форм и дериватизации выделенных соединений.

Учитывая преобладание в моче для рассматриваемых каннабимиметиков метаболитов (1) и 8-гидроксихинолина (2), последние предложены в качестве маркеров для целей выявления случаев употребления РВ-22, РВ-22F и FUB-РВ-22.

Характерной особенностью каннабимиметиков группы индазола, производных амида валина, является гидролиз концевой амидной группы в организме человека при биотрансформации. Это приводит к образованию соответствующих каннабимиметичу метаболитов, содержащих карбоксильную группу, которые могут использоваться как маркеры для выявления употребления веществ данной группы. Все идентифицированные метаболиты АВ-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-FUBINACA, AB-CHMINACA были обнаружены в элюате I.

Общая схема образования маркеров синтетических каннабимиметиков из АВ-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-FUBINACA, AB-CHMINACA представлена на рисунке 16.

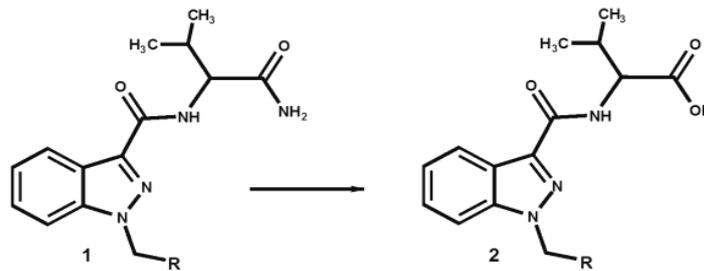


Рисунок 16 – Структурные формулы каннабимиметиков АВ-PINACA (R= *n*-бутил), 5F-AB-PINACA (R= 4-фтор-*n*-бутил), AB-FUBINACA (R = 4-фторфенил), AB-CHMINACA (R = циклогексил) (1) и их маркеров (2)

Кроме основного направления биотрансформации, связанного с гидролизом терминальной амидной группы, наблюдаются следующие процессы: гидролиз амидной группы в положении 3 индазольного цикла, гидроксилирование ароматических и алифатических фрагментов соединений, а также последующее окисление. Вторым этапом метаболизма является конъюгирование карбоксильных и гидроксильных метаболитов с последующим выведением их с мочой.

Структурные формулы метаболитов 5F-AB-PINACA, идентифицированных при исследовании образцов мочи лиц, употреблявших курительные смеси, представлены на рисунке 17.

Установлено, что идентифицированные метаболиты PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, АВ-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, AB-FUBINACA выводятся из организма человека с мочой в значительной степени или частично в конъюгированном виде. Для гидролиза конъюгатов предпочтительным является ферментативный гидролиз.

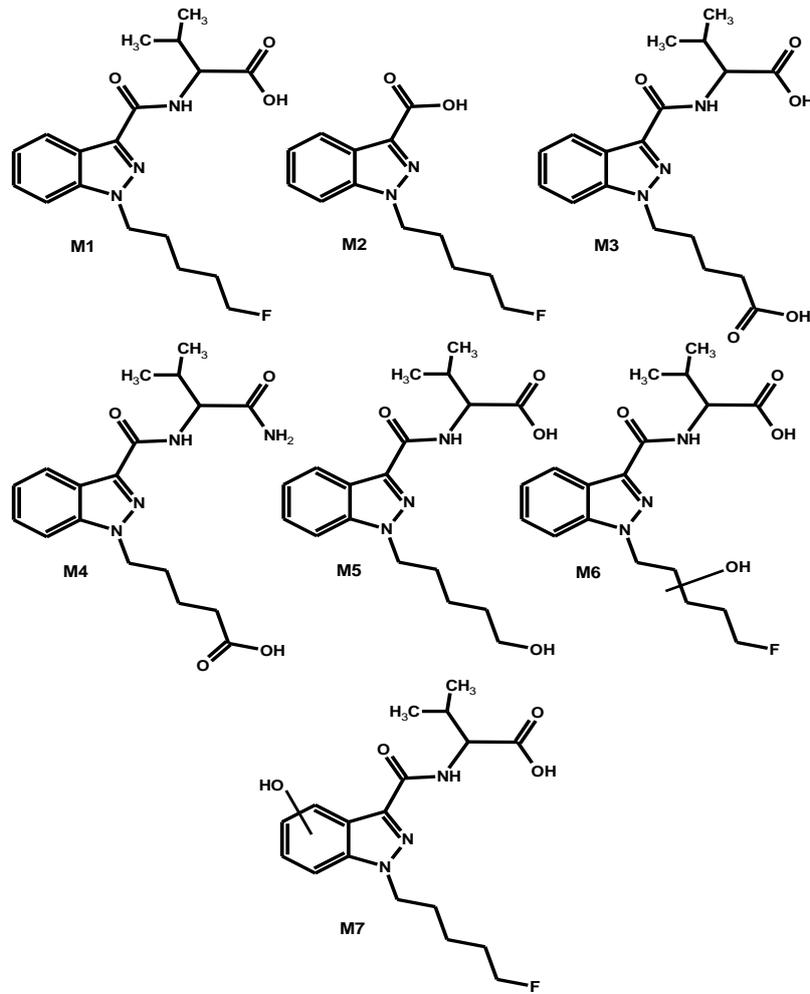


Рисунок 17 – Химические структуры предполагаемых метаболитов каннабимиметика 5F-AB-PINACA

Проведены исследования по **сравнению эффективности экстракции природных каннабиноидов и синтетических каннабимиметиков**, поскольку при экспертных исследованиях в реальных пробах мочи были зафиксированы факты совместного присутствия природных каннабиноидов и маркеров синтетических каннабимиметиков. Были проанализированы и оценены возможности трех методов пробоподготовки мочи с использованием ЖЖЭ и ТФЭ, а также различных вариантов гидролиза и дериватизации. Результаты оценки выхода целевых аналитов для трех методов приведены в таблице 18.

Для исследования использовались N-[(1-пентил-1*H*-индазол-3-ил)карбонил]валин (AB-PINACA M1) и N-(1*H*-индазол-3-илкарбонил)валин (нор-AB-PINACA M1), являющиеся метаболитами синтетического каннабимиметика N-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-пентил-1*H*-индазол-3-карбоксаид (AB-PINACA), а также 11-нор- $\Delta^8$ -тетрагидроканнабинол-9-карбоновая кислота ( $\Delta^8$ -ТГК-СООН) в качестве аналога маркера употребления  $\Delta^9$ -тетрагидроканнабинола.

**Метод 1** (щелочной гидролиз, ЖЖЭ, получение метильных дериватов в присутствии безводного диметилсульфоксида, метилйодида и метанольного раствора тетраметиламмония гидроксида) разработан для определения 11-нор- $\Delta^9$ -тетрагидроканнабиварин-9-карбоновой и 11-нор- $\Delta^9$ -тетрагидроканнабинол-9-карбоновой

кислот в моче потребителей каннабиса, в дальнейшем была показана возможность применения данного метода для совместного скрининга мочи на метаболиты природных и синтетических каннабиноидов. Выходы АВ-PINACA M1 и  $\Delta^8$ -ТГК-СООН близки к 100 %, в то время как значения выхода метаболита нор-АВ-PINACA M1 менее 10 %. Последнее обусловлено гидрофильными свойствами нор-АВ-PINACA M1.

**Метод 2** (щелочной гидролиз, ЖЖЭ, получение метильных дериватов в присутствии безводного ацетона, метилйодида и безводного карбоната калия) в различных модификациях традиционно широко применяется для определения метаболитов каннабиноидов как природного, так и синтетического характера. Метод показал самый высокий выход для нор-АВ-PINACA M1 и самые низкие выходы для АВ-PINACA M1 и  $\Delta^8$ -ТГК-СООН. Для двух последних аналитов это связано с высокой липофильностью, потери веществ могут быть обусловлены адгезией на поверхности используемой посуды.

**Метод 3** (ферментативный гидролиз  $\beta$ -глюкуронидазой, ТФЭ, получение метильных дериватов в присутствии безводного ацетона, карбоната калия и йодистого метила) применяется для скрининга лекарственных и наркотических веществ в моче. Значения величин выхода для АВ-PINACA M1 и  $\Delta^8$ -ТГК-СООН можно оценить как значительные, для нор-АВ-PINACA M1, как среднее.

Таблица 18 – Эффективность экстракции маркеров природных и синтетических каннабиноидов при сравнении методов пробоподготовки мочи, %

Метод	Эффективность экстракции, % (n=5, RSD, %)		
	нор-АВ-PINACA M1	АВ-PINACA M1	$\Delta^8$ -ТГК-СООН
Метод 1	7,6 ± 17,9	95,2 ± 14,3	95,5 ± 8,3
Метод 2	22,1 ± 10,7	55,0 ± 7,8	34,6 ± 8,3
Метод 3	13,0 ± 27	102,3 ± 10	60,3 ± 16

Результаты эксперимента показали, что с различными выходами маркеров, но все три метода могут быть использованы для определения природных и синтетических каннабиноидов. По результатам сравнения существующих подходов к пробоподготовке мочи с целью выявления метаболитов новых синтетических и природных каннабиноидов при совместном присутствии к использованию рекомендована скрининговая методика с применением ТФЭ в сочетании с ферментативным гидролизом.

**В главе 5** приведены исследования по выявлению основных метаболитов синтетического наркотического анальгетика ацетилфентанила в посмертных образцах мочи его потребителей с использованием методов ГХ-МС и ЖХ-МС.

Предполагаемые структуры метаболитов подтверждены их фрагментацией под действием электронного удара и химической ионизацией при атмосферном давлении. Получены масс-спектральные и хроматографические характеристики некоторых дериватов (ацетилированных, пропионовых, пентафторпропионовых) метаболитов ацетилфентанила.

На рисунке 18 приведена схема биотрансформации ацетилфентанила (соединение 1) в организме человека, составленная нами по результатам исследования образцов мочи от трупов после передозировок ацетилфентанила.

Из схемы следует, что в отличие от описанных ранее фентанила и  $\alpha$ -метилфентанила, основным путем биотрансформации ацетилфентанила является не N-деалкилирование, а гидроксирование по фенилэтильному фрагменту (метаболиты M3, M5, M7-M10 на рисунок 18).

Таким образом, к основным путям метаболизма ацетилфентанила относятся:

- ароматическое гидроксирование (метаболиты M3, M5, M7-M10);
- N - деалкилирование (нор-метаболиты M2, M6);
- N - деацетилирование (метаболиты M4-M6, M9, M10);
- конъюгация метаболитов M3, M5, M7-M10, в том числе метилирование одного из гидроксильных у дигидроксилированных метаболитов (метаболиты M8, M10).

На рисунке 19 приведена типичная хроматограмма (ГХ-МС) ионного профиля экстракта мочи потребителя ацетилфентанила после кислотного гидролиза и ацетилирования. Наибольшую интенсивность на хроматограммах различных производных по общему ионному току имеют пики гидроксированных метаболитов (M3 и M8 на рисунке 18), тогда как деацетилированные метаболиты ацетилфентанила были малоинтенсивны.

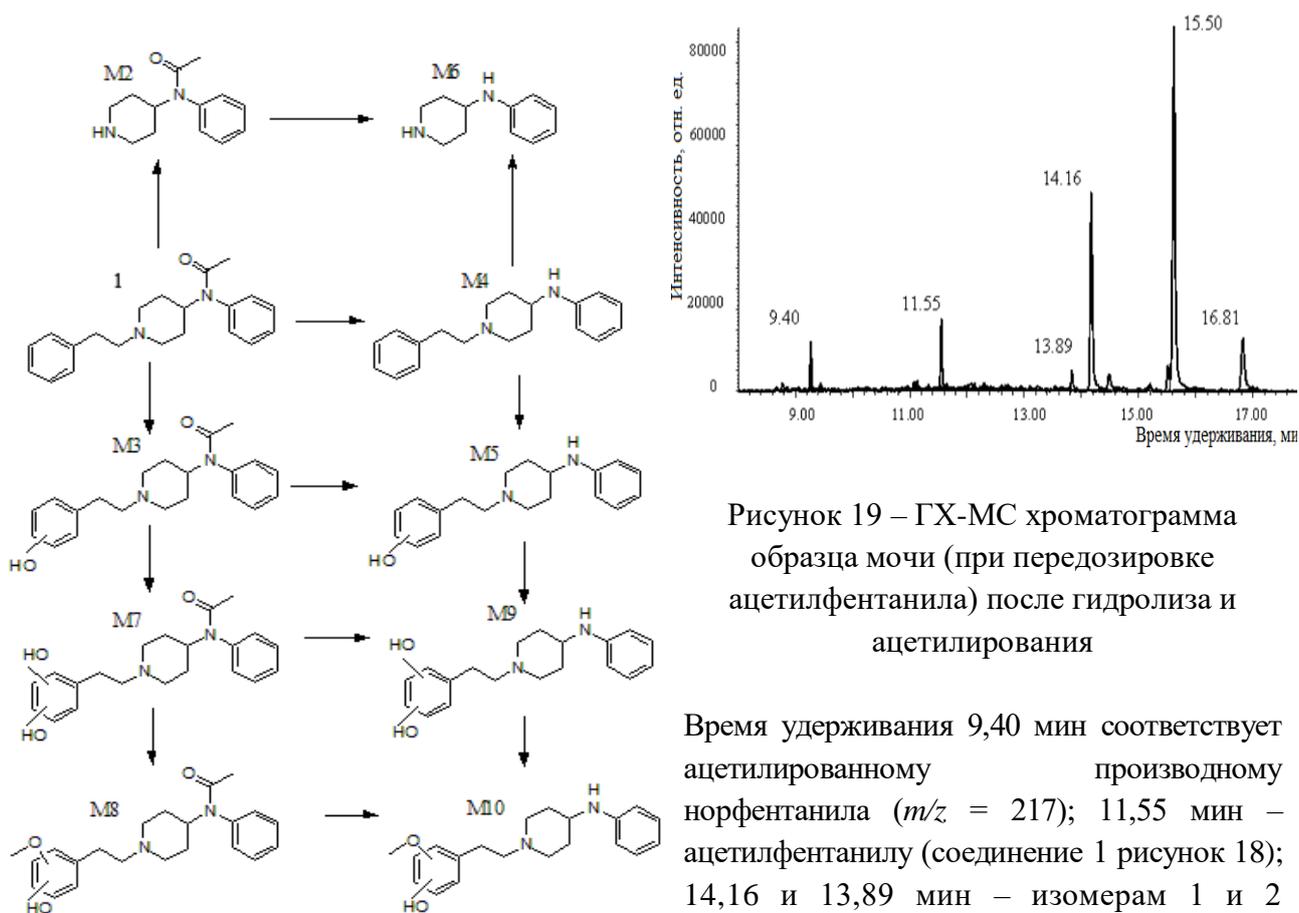


Рисунок 18 – Предполагаемая схема биотрансформации ацетилфентанила в организме человека (со стадией образования метильных конъюгатов)

Рисунок 19 – ГХ-МС хроматограмма образца мочи (при передозировке ацетилфентанила) после гидролиза и ацетилирования

Время удерживания 9,40 мин соответствует ацетилированному производному норфентанила ( $m/z = 217$ ); 11,55 мин – ацетилфентанилу (соединение 1 рисунок 18); 14,16 и 13,89 мин – изомерам 1 и 2 ацетилированных производных M3; 15,50 мин – ацетилированному производному M8 и 16,81 мин – диацетилированному производному M7

В фазе II метаболизма ацетилфентанила происходит конъюгирование гидроксированных по фенилэтильному фрагменту метаболитов, в том числе происходит метилирование одного из гидроксильных групп.

Степень конъюгирования всех идентифицированных гидроксированных метаболитов находится в пределах от  $74 \pm 10\%$  ( $n=3$ ) для моногидроксированных и до  $100\%$  ( $n=3$ ) для дигидроксированного метаболита.

Для обнаружения фактов употребления ацетилфентанила наиболее удобно использование ацетилирования экстрактов мочи. Так как после ацетилирования отношение сигнал/шум аналитических сигналов возрастает за счет сложения сигналов производных гидроксированных метаболитов и их N-дезацетилированных аналогов. Для идентификации отдельных метаболитов рекомендуется использовать пентафторпропионовые производные. В качестве маркеров употребления ацетилфентанила в моче следует использовать метаболиты М3 и М8 и сам ацетилфентанил (рисунок 18).

### **Научно-методологические подходы к скринингу лекарственных и наркотических веществ в биологических объектах с использованием ТФЭ и ГХ-МС**

На основе проведенных экспериментальных исследований разработан единый методологический подход к скринингу лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов в биологическом материале с использованием ТФЭ и ГХ-МС, включающий:

- пробоподготовку биологического объекта до этапа ТФЭ и добавление внутренних стандартов для контроля процедур подготовки проб. Пробоподготовка осуществляется в зависимости от вида биологического объекта (биожида, печень, почка и др.) с процедурой разбавления буферным раствором, центрифугированием и получением надосадочной жидкости (супернатанта);
- проведение процедуры твердофазной экстракции на патроне со смешанной фазой, предусматривающей подбор рациональных условий для кондиционирования патрона, загрузки надосадочной жидкости с контролируемой скоростью, промывки, сушки патрона, элюирования с фракционированием веществ на соединения кислотного, нейтрального, основного характера и получением элюатов;
- процедуру дериватизации, для улучшения газохроматографических свойств полярных соединений с образованием метильных (для элюата I) и ацетильных (для элюата II) производных лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов;
- аналитический этап методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, обработку полученных хроматограмм и масс-спектров с применением специализированных библиотек с целью идентификации и количественного определения лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов;
- оформление результатов анализа по выявлению лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов в биологических объектах (рисунок 20).

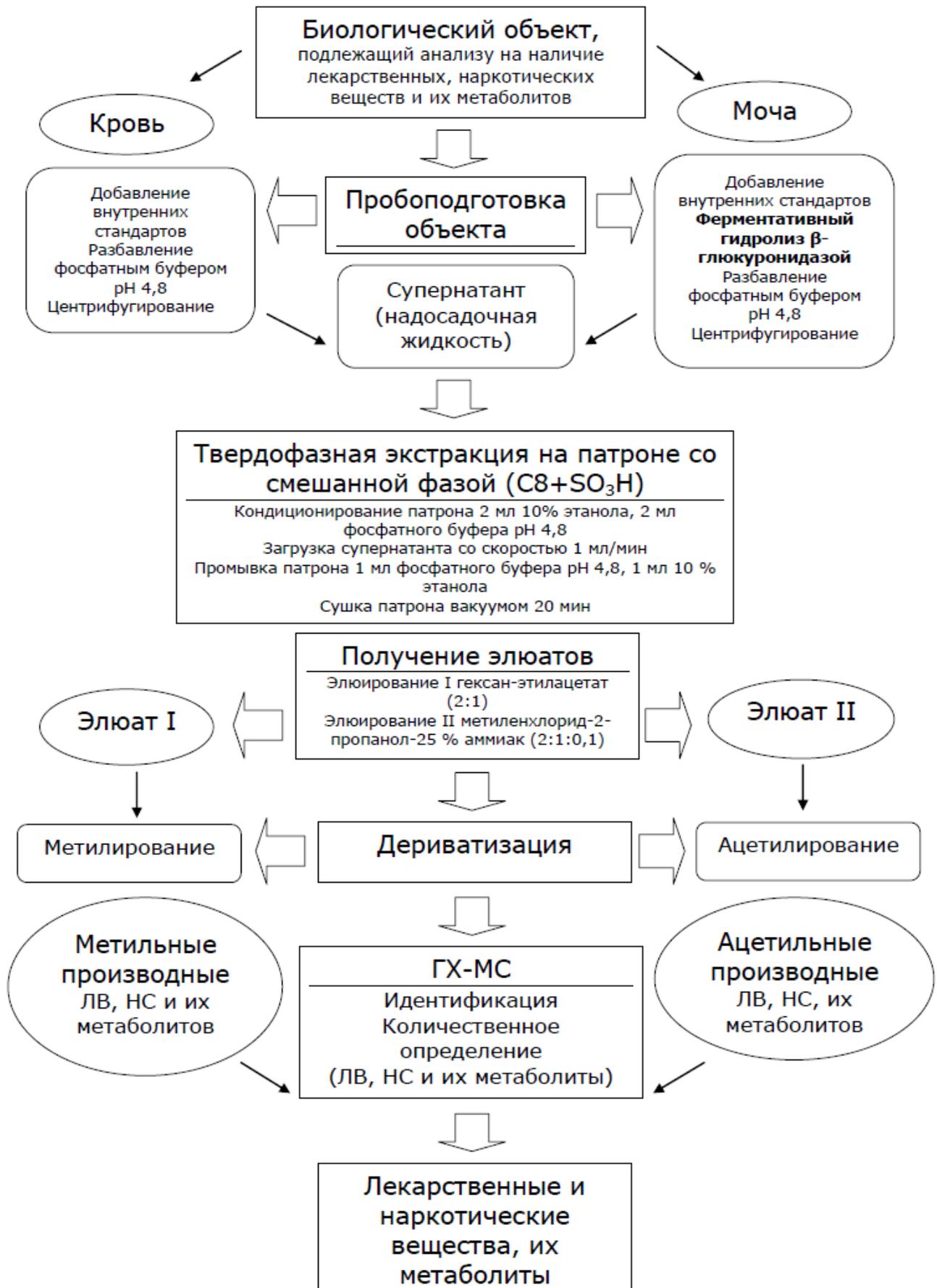


Рисунок 20 – Схема скрининга лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов в биологических объектах с использованием ТФЭ и ГХ-МС

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. На примере исследования модельных соединений с различными кислотно-основными и липофильно-гидрофильными свойствами разработана методика скринингового исследования крови на наличие лекарственных и наркотических веществ с применением ТФЭ и ГХ-МС. С использованием компьютерного моделирования Бокса-Бенкена и подтверждающих экспериментальных исследований установлены оптимальные параметры ТФЭ на патронах со смешанной фазой, которые могут быть применены для скрининга широкого круга токсикологически значимых веществ.

2. Разработана методика идентификации и количественного определения некоторых НПВС при скрининге лекарственных и наркотических веществ в крови с применением ТФЭ и ГХ-МС. На основе процедуры валидации показана пригодность методики для количественной оценки содержания индометацина, кетопрофена, напроксена, ибупрофена и диклофенака в крови.

3. Оценена эффективность подготовки проб крови для целей скрининга лекарственных и наркотических веществ с применением патронов ТФЭ со смешанной фазой разных производителей. Показана возможность использования патронов марок Bond Elut Certify (Varian), Chromabond Drug (Macherey-Nagel), Strata Screen-C (Phenomenex), EVIDEX SampliQ (Agilent) и HyperSep Verify-CX (Thermo). Исходя из показателей максимальных выходов анализируемых веществ и экономичности, к применению в экспертной практике рекомендованы патроны двух марок: Strata Screen-C (Phenomenex) и EVIDEX SampliQ (Agilent).

4. При апробации разработанной методики скрининга крови на реальных образцах цельной и посмертной крови выявлено 111 токсикологически значимых соединений, а также их метаболитов, которые сгруппированы по кислотно-основным и гидрофильно-липофильным свойствам на основании рассчитанных значений  $pK_a$  и  $\log P$ . Среди выявленных соединений также обнаружены неизменные метилendioксипировалерон, пирролидиновалерофенон и их метаболиты; метаболиты каннабимиметиков АВ-PINACA и AMB, MDMB(N)-2201, АВ-FUBINACA, 5-F-AB-PINACA, АВ-CHMINACA, XLR-11.

5. Впервые в процедуре скрининга реальных образцов мочи с применением методов ТФЭ и ГХ-МС выявлены основные метаболиты и маркеры синтетических каннабимиметиков PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, АВ-PINACA, 5F-AB-PINACA, АВ-FUBINACA, АВ-CHMINACA, позволяющие установить факт их употребления.

Рассчитаны физико-химические и получены газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики некоторых производных основных метаболитов PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, АВ-PINACA, 5F-AB-PINACA, АВ-CHMINACA, АВ-FUBINACA. Установлено, что идентифицированные метаболиты данных синтетических каннабимиметиков выводятся из организма человека с мочой в значительной степени или частично в конъюгированном виде. Для гидролиза конъюгатов предпочтительным является ферментативный гидролиз.

6. По результатам сравнения нескольких методов пробоподготовки мочи с использованием различных вариантов гидролиза, экстракции и дериватизации установлено, что для выявления метаболитов новых синтетических и природных

каннабиноидов при совместном присутствии наиболее эффективно применение твердофазной экстракции в сочетании с ферментативным гидролизом.

7. По результатам исследования образцов посмертной мочи после передозировок нового синтетического наркотического анальгетика ацетилфентанила с использованием методов газовой и жидкостной хроматографии выявлены его основные метаболиты и предложены маркеры, доказывающие факт употребления ацетилфентанила. Получены масс-спектральные и хроматографические характеристики некоторых производных метаболитов ацетилфентанила. Установлено, что основным путем биотрансформации ацетилфентанила является гидроксирование по фенилэтильному фрагменту с последующим конъюгированием глюкуроновой кислотой и метилированием одного из гидроксильных групп.

8. Предложен научно-методологический подход к скринингу токсикологически значимых веществ и их метаболитов в биологическом материале с использованием твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, позволяющий эффективно использовать поисковые библиотеки масс-спектров для идентификации и количественного определения лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов.

**Перспективы применения.** Разработанный научно-методологический подход к скринингу лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов с использованием ТФЭ и ГХ-МС может быть использован в химико-токсикологическом и судебно-химическом анализе при серийной пробоподготовке различных биологических объектов, что позволит оптимизировать деятельность соответствующих экспертных подразделений.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

##### **Публикации в изданиях, входящих в реферативную базу SCOPUS**

1. Катаев, С. С. Применение твердофазной экстракции в исследовании крови на наркотические и лекарственные вещества / С. С. Катаев, О. Н. Дворская // Судебно-медицинская экспертиза. – 2012. – Т. 55, № 4. – Р. 38–43.
2. Мелентьев, А. Б. Идентификация и аналитические характеристики метаболитов ацетилфентанила / А. Б. Мелентьев, С. С. Катаев, О. Н. Дворская // Журнал аналитической химии. – 2015. – Т. 70, № 2. – С. 216–224.
3. Оценка концентрации некоторых нестероидных противовоспалительных средств в процедуре скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови / О. Н. Дворская и др.] // Судебно-медицинская экспертиза. – 2016. – Т. 59, №3. – С. 24–30.
4. Катаев, С. С. Оптимизация процедуры твердофазной экстракции для скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / С. С. Катаев, О. Н. Дворская, И. П. Крохин // Судебно-медицинская экспертиза. – 2017. – Т. 60, № 1. – Р. 29–35.
5. Дворская О. Н. Опыт применения твердофазной экстракции в скрининге лекарственных и наркотических веществ в крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / О. Н. Дворская, И. П. Крохин, С. С. Катаев // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т. 51, № 3. – С. 36–40.

**В журналах из списка, рекомендованного ВАК России**

6. Катаев, С. С. Идентификация маркеров каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F в моче методом ГХ-МС / С. С. Катаев, Н. Б. Зеленина, О. Н. Дворская // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т. 34, № 4. – С. 116–122.
7. Катаев С. С. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-PINACA в моче методом ГХ-МС / С. С. Катаев, Н. Б. Зеленина, О. Н. Дворская // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т. 35, № 9. – С. 131–138.
8. Катаев, С. С. Идентификация метаболитов каннабимиметика РВ-22 в моче / С. С. Катаев, А. Б. Мелентьев, О. Н. Дворская // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т. 36, № 10. – С. 29–36.
9. Идентификация маркеров каннабимиметика АВ-FUBINACA в моче методом ГХ-МС / А. Б. Мелентьев [и др.] // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т. 36, № 11. – С. 111–118.
10. Катаев, С.С. Идентификация метаболитов каннабимиметика FUB-PB-22 в моче / С. С. Катаев, О.Н. Дворская // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т.36, № 12. – С.15–21.
11. Катаев, С. С. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-CHMINACA в моче методом ГХ-МС / С. С. Катаев, О. Н. Дворская // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т. 36, № 12. – С. 27–33.
12. Катаев, С.С. Идентификация метаболитов каннабимиметика РВ-22F в моче / С.С. Катаев, О.Н. Дворская // Бутлеровские сообщения. – 2014. – Т.37. – №2. – С.114.–121.
13. Маркеры новых синтетических каннабимиметиков в моче / О. Н. Дворская [и др.] // Наркология. – 2014. – Т. 13, № 3(147). – С. 55–65.
14. Катаев, С.С. Идентификация метаболитов каннабимиметика 5F-AB-PINACA в моче методом ГХ-МС / С.С. Катаев [и др.] // Бутлеровские сообщения. – 2014. – Т.39, №8. – С. 150–160.
15. Дворская, О. Н. Определение ряда нестероидных противовоспалительных средств в крови в скрининге методами твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, И. П. Крохин // Бутлеровские сообщения. – 2015. – Т. 43, № 7. – Р. 149–153.
16. Катаев, С. С. Сравнение эффективности твердофазной экстракции лекарственных и наркотических веществ из крови для патронов со смешанной фазой некоторых брендов / С. С. Катаев, О. Н. Дворская // Фармация и фармакология. – 2017. – Т. 5, № 6. – С. 543–555.

**В прочих изданиях**

17. Катаев, С. С. Определение в моче основных метаболитов каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F методом ГХ-МС / С. С. Катаев, Н. Б. Зеленина, О. Н. Дворская // Проблемы экспертизы в медицине. – 2013. – Т. 13, № 2[50]. – С. 28–30.
18. Катаев, С. С. Сравнение различных вариантов пробоподготовки для выявления маркеров синтетических и природных каннабиноидов в моче / С. С. Катаев, О. Н. Дворская, Ю. Н. Аникина // Организация судебно-медицинской службы России на современном этапе: задачи, пути решения, результаты : тр. Всерос. науч.-практ. конф. (20–22 апреля 2016 года). – Воронеж, 2016. – С. 432–437.
19. Катаев, С.С. Влияние уксусной кислоты на эффективность экстракции лекарственных и наркотических веществ при скрининге крови / С. С. Катаев, О. Н. Дворская, И. П. Крохин // Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами: Мат. II Всерос. науч.-практ. конф. с

международным участием, посвященной 80-летию Пермской государственной фармацевтической академии (12-14 мая 2016 года). – Пермь, 2016. – С.71–75.

20. Скрининг лекарственных и наркотических веществ, их метаболитов в крови с использованием твердофазной экстракции : информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 15 декабря 2015 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, И. П. Крохин. – 16 с.

21. Идентификация маркеров некоторых синтетических каннабиноидов в биологических объектах : информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 1 от 17 марта 2017 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, И. П. Крохин. – 34 с.

22. Дворская, О. Н. Сравнение эффективности жидкость-жидкостной и твердофазной экстракции лекарственных веществ на дисках серии SPEC MP3 / О. Н. Дворская, С. С. Катаев // Достижения и перспективы в области создания новых лекарственных средств : материалы Рос. науч.-практ. конф., посвящ. 70-летию ПГФА. – Пермь, 2007. – С. 172–177.

23. Дворская, О. Н. Эффективность экстракции лекарственных веществ на дисках для ТФЭ серии SPEC C18 и MP3 / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, Р. Р. Сунгатуллина // Вест. Перм. гос. фарм. акад. – 2007. – № 2. – С. 133–136.

24. Горохова, Ю.В. Использование патронов «AccuBond EVIDEX» при исследовании крови на наличие токсикологически значимых веществ/ Ю.В. Горохова, О.Н. Дворская // Вест. Перм. гос. фарм. акад. – 2010. – №6. – С.161–163.

25. Дворская, О.Н. Сравнение эффективности жидкость-жидкостной и твердофазной экстракции с использованием патронов «AccuBond II EVIDEX» при исследовании крови на наличие токсикологически значимых веществ / О.Н. Дворская // Вест. Перм. гос. фарм. акад. – 2010. – №4. – С.264–268.

26. Идентификация метаболитов каннабимиметика РВ-22 в моче : информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 12 декабря 2013 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, А.Б. Мелентьев. – 21 с.

27. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-PINACA в моче : информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 12 декабря 2013 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев. – 17 с.

28. Волкова, Е.С. Синтетические каннабимиметики – алкилиндолы группы 8-оксихинолина, выявленные в Пермском крае в 2012-2013 годах / Е.С. Волкова, О. Н. Дворская // Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами: материалы межрегиональной науч.-практ. конф. с международным участием (15-17 мая 2014 года). – Пермь, 2014. – С. 28.–31.

29. Стрелкова, Д.В. Синтетические каннабимиметики группы алкилиндазола, выявленные в Пермском крае в 2013 году / Д.В. Стрелкова, О.Н. Дворская // Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами: материалы межрегиональной науч.-практ. конф. с международным участием (15-17 мая 2014 года). – Пермь, 2014. – С. 71–75.

### Монография

30. Мелентьев, А. Б. Дизайнерские наркотики. Метаболизм и подходы к анализу в биологических средах / А. Б. Мелентьев, С. С. Катаев, О. Н. Дворская. – Москва : Изд-во «Перо», 2016. – 326 с.

Дворская Оксана Николаевна (Россия)

**Научно-методологические подходы к скринингу лекарственных и наркотических веществ в биологических жидкостях с использованием твердофазной экстракции**

Разработан единый научно-методологический подход к скринингу лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов в биологическом материале с использованием твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием для целей химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Dvorskaya Oхana Nikolaevna (Russia)

**Scientific and methodological approaches to screening medications and drugs in biological fluids using solid-phase extraction**

A unified scientific and methodological approach has been developed for screening medications, drugs and their metabolites in biological material using solid phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection for purposes of chemical toxicological and forensic chemical analysis.

Автор выражает глубокую благодарность и признательность заведующему судебно-химическим отделением Пермского краевого бюро судебно-медицинской экспертизы, к.х.н. **Катаеву С.С.**, заведующему судебно-химическим отделением Челябинского областного бюро судебно-медицинской экспертизы, к.х.н. **Мелентьеву А.Б.** за сотрудничество, понимание и помощь, оказанную на всех этапах работы над диссертацией.

Автор благодарит научного консультанта диссертационного исследования судебного эксперта-химика Московского областного бюро судебно-медицинской экспертизы, д.х.н. **Григорьева А.М.** за профессионализм и поддержку при подготовке диссертации к защите.