

На правах рукописи



Дукова Ольга Александровна

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ
ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКЛОФЕНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ
ОБЪЕКТАХ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ И
ТАНДЕМНЫМИ МЕТОДАМИ**

02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Томск – 2017

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский федеральный университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Ефремов Александр Алексеевич

Официальные оппоненты: **Перкель Александр Львович**
доктор химических наук, профессор
ФГБОУ ВПО «Кузбасский государственный
технический университет имени Т.Ф. Горбачева»,
кафедра технологии органических веществ и
нефтехимии, профессор

Дычко Константин Александрович
кандидат химических наук, доцент
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
Томский государственный университет», кафедра
органической химии, доцент

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова»

Защита состоится 8 февраля 2017 г. в 14.30 часов на заседании диссертационного совета Д 212.269.04 на базе ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» по адресу: 634050 г. Томск, пр. Ленина, 30, корпус 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» и на сайте: <http://portal.tpu.ru/council/911/worklist>

Автореферат разослан «___» декабря 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



Т.М. Гиндуллина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Проблема немедицинского употребления лекарств последнее десятилетие стала одной из самых острых. Особую озабоченность вызывает злоупотребление лекарственными препаратами, оказывающими обезболивающее, а также снотворное и седативное действие. К их числу следует отнести буторфанол, донормил, кетанал, имован, феназепам, amitриптилин, декстрометорфан и др. В круг этих препаратов входит такое лекарственное средство как баклофен, в отношении которого стали чаще появляться сообщения об отравлениях. По своей химической структуре баклофен сходен с производными γ -аминомасляной кислоты (ГАМК). Основное проявление его фармакологической активности – антиспастическое действие, уменьшение мышечного напряжения; кроме того, баклофен оказывает также анальгезирующее действие.

Наличие случаев отравления баклофеном обуславливает необходимость изучения данного соединения в химико-токсикологическом и судебно-химическом аспекте. Для подтверждения диагноза отравления баклофеном и последующего правильного лечения необходимо иметь надежные, достоверные и чувствительные методики его качественного и количественного определения в биологических жидкостях. Существующие методики анализа баклофена в биологических объектах не универсальны, предусматривают использование дорогостоящих и труднодоступных реагентов и детекторов и не предназначены для рутинного анализа. Таким образом, актуальным является систематическое исследование по разработке и оптимизации методик судебно-химического и химико-токсикологического анализа баклофена в биообъектах.

Цель и задачи исследования. Целью диссертационной работы являлась разработка новых и усовершенствование существующих хроматографических методик идентификации и количественного определения баклофена в биологических объектах при судебно-химическом и химико-токсикологическом исследовании. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить хроматографические условия определения баклофена методами ТСХ, ГХ/МС, ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС.

2. Оценить возможности применения существующих методик скрининга, используемых в химико-токсикологическом анализе и судебно-химических исследованиях, для идентификации баклофена в биологических объектах.

3. Разработать алгоритмы пробоподготовки для хроматографического определения баклофена в биологических объектах.

4. Создать хроматографические методики анализа биологических объектов для идентификации и количественного определения баклофена и апробировать их на реальных образцах, установить метрологические характеристики разработанных методик.

5. На основании разработанных методик предложить схемы судебно-химического и химико-токсикологического исследования для идентификации и количественного определения баклофена в биологических объектах.

Научная новизна. Установлено, что при исследовании баклофена методом ГХ/МС необходимо проведение стадии дериватизации. Впервые доказано влияние различных модификаторов подвижной фазы на аналитический сигнал баклофена при определении его методом ВЭЖХ-УФ. Подобраны условия MRM-переходов баклофена при использовании метода ВЭЖХ-МС/МС. Показана необходимость использования метода ВЭЖХ с различными вариантами детектирования при определении баклофена в образцах крови и мочи.

Практическая значимость. Впервые предложен комплекс методик обнаружения, идентификации и количественного определения баклофена в биологических объектах хроматографическими и тандемными методами для целей химико-токсикологических и судебно-химических исследований. Полученные результаты используются на кафедрах биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава РФ и фармацевтической химии ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России в качестве лекционного материала и методических рекомендаций для практических занятий по темам «Хроматография» и «Спектрофотометрия».

Разработанные методики внедрены в практику судебно-химических отделений КГБУЗ «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы», ОГУЗ «Челябинское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», отдела газожидкостной, жидкостной и времяпролетной масс-спектрометрии Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава РФ. Разработано информационное письмо «Об определении баклофена в биологических объектах», предназначенное для судебных экспертов-химиков бюро судебно-медицинской экспертизы, врачей-лаборантов химико-токсикологических лабораторий.

Связь задач исследования с планами научных работ. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований кафедры аналитической и органической химии Сибирского федерального университета и кафедры фармацевтической химии Сибирского государственного медицинского университета.

Основные положения, выносимые на защиту:

- хроматографические условия определения баклофена методами ГХ/МС, ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-МС/МС;
- способы пробоподготовки биологических объектов для определения баклофена;
- результаты разработки методик идентификации и количественного определения баклофена в биологических объектах, проверки правильности и повторяемости разработанных методик;
- результаты апробации разработанных методик для идентификации и количественного определения баклофена в реальных биологических объектах.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на VI Всероссийской научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодежь и наука в третьем тысячелетии» (Красноярск, 2010); на VI Всероссийской конференции молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев-2012» (Санкт-Петербург, 2012); на I Международной научно-практической конференции

«Современная химико-токсикологическая экспертиза» I International scientific conference АСТЕ'2013 (Москва, 2013); на Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии» с международным участием, посвященной памяти проф. М.С. Вигдергауза (Самара, 2015); на научных семинарах кафедры аналитической и органической химии ИЦМиМ СФУ и кафедры фармацевтической химии СибГМУ (Красноярск, 2008-2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 5 – в изданиях, рекомендованные ВАК РФ.

Экспериментальные исследования по теме диссертации выполнялись на базе Центра коллективного пользования Сибирского федерального университета (г. Красноярск) и в судебно-химическом отделении КГБУЗ «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы» (г. Красноярск), а также в сотрудничестве с коллективами других научных организаций: Центральная научно-исследовательская лаборатория Красноярского государственного медицинского университета имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава РФ (г. Красноярск), отделение острых отравлений КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н.С. Карповича» (г. Красноярск).

Личный вклад автора. Основные экспериментальные результаты, приведенные в диссертации, получены самим автором или при его непосредственном участии. Автором выполнены исследования по изучению спектроскопических и хроматографических характеристик баклофена, по разработке методик качественного и количественного определения баклофена в биологических жидкостях (крови, мочи), по оценке пригодности методик химико-токсикологического и судебно-химического скрининга для обнаружения баклофена, по применению разработанных методик для анализа реальных образцов биологических объектов. Обсуждение полученных результатов и подготовка материалов для публикаций проводилась совместно с научным руководителем и соавторами.

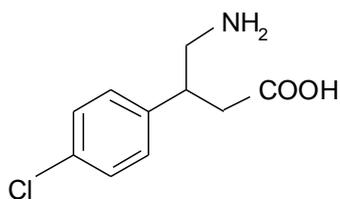
Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, трех глав экспериментальных исследований, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Материал работы изложен на 113 страницах,

включает 15 таблиц, 30 рисунков. Библиографический указатель включает 133 наименований, из них 80 зарубежных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Объекты, методы исследования, аппаратура и условия

Объектами исследования являлись лекарственный препарат «Баклофен» («Polpharma PW», Польша) 10 и 25 мг, полученная из него субстанция баклофена, а также стандартный образец баклофена с чистотой 98% (Sigma, США).



$C_{10}H_{12}ClNO_2$ М. м. 213,7

Рис. 1. Структурная формула баклофена

Активным действующим веществом в препарате «Баклофен» является 4-амино-3-(4-хлорфенил)-бутановая кислота – баклофен (рис. 1). По структуре баклофен является производным γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) и сходен с аминалоном и фенибутом.

Для изучения методов изолирования и обнаружения баклофена в биологических объектах, а также для построения градуировочных графиков и валидации разработанных методик использовали образцы крови, мочи и внутренних органов (печени, стенки желудка), предварительно проверенные на отсутствие наркотических и лекарственных веществ, предоставленные Краевым государственным бюджетным учреждением здравоохранения «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы» (ККБСМЭ). Для изолирования баклофена из биологических объектов применяли жидкость-жидкостную экстракцию, элементы твердофазной экстракции, центрифугирование.

Для подтверждения подлинности и установления чистоты субстанции баклофена, выделенной из таблеток препарата, определяли ее температуру плавления, а также снимали УФ- и ИК-спектры. ИК-спектры субстанции баклофена получали с помощью ИК-Фурье спектрометра Bruker Alpha (Германия). УФ-спектры снимали на спектрофотометре Thermo Helios γ (Thermo Electron Corporation, США) в кварцевых кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм. Хроматографирование в тонком слое выполняли в восходящем токе системы растворителей при комнатной температуре в герметически закрытых стеклянных камерах, предварительно

насыщенных заданной системой, используя хроматографические пластины «Sorbfil ПТСХ-АФ-А» (Россия). Нанесение исследуемых образцов на хроматографические пластины осуществляли при помощи капилляров и калибровочных микропипеток.

Исследование баклофена методом ГХ/МС проводили с помощью газового хроматографа Agilent Technologies 6890N (США) с автосамплером Agilent Technologies 7683В и квадрупольным масс-спектрометром Agilent Technologies 5973 Network в качестве детектора. Использовали кварцевую капиллярную колонку HP-5MS длиной 30 м, с внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0.25 мкм. Режим программирования температуры колонки: начальная температура термостата колонки 80 °С, экспозиция при начальной температуре 1 мин, далее нагрев до температуры 200 °С со скоростью 40 °С/мин и до температуры 300 °С со скоростью 12.5 °С/мин, экспозиция 10 мин при конечной температуре. В качестве газа-носителя использовали гелий (марка А); скорость потока газа-носителя 1.2 мл/мин (режим постоянного потока). Температура инжектора – 250 °С. Ввод пробы осуществляли с помощью автосамплера в режиме без деления потока (Splitless); объем пробы – 1 мкл. Ионизация электронным ударом (70 эВ). ГХ/МС анализ исследуемых растворов проводили в режиме сканирования по полному ионному току (SCAN) в диапазоне масс от 40 до 600 а.е.м.

Исследования методом ВЭЖХ-УФ проводили с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent Technologies 1200 (США) с многоволновым диодно-матричным детектором. Условия анализа: колонка Phenomenex Luna 5u C18(2) 100 А, 250×4.6 мм, 5 мкм; предколонка Eclipse XDB-C18 4-Pack 4,6x12,5 мм, 5 мкм. Температура термостата колонки 30 °С. Элюирующий буфер (подвижная фаза, ПФ): ацетонитрил – вода с модификаторами, градиентное элюирование, начальная концентрация ацетонитрила в элюирующем буфере 10%, в течение 3 мин анализа концентрация ацетонитрила повышалась до 20%

Исследования методом ВЭЖХ-МС/МС проводили с помощью жидкостного хроматографа UltiMate 3000 (Dionex, Германия) с масс-спектрометрическим детектором тройной квадруполь с линейной ионной ловушкой QTRAP 5500 (AB SCIEX, Канада), оснащенного хроматографической колонкой Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 мкм, 150 × 4,6 мм). Режим ВЭЖХ/МС-МС анализа: температура термостата

колонок 37 °С, элюирующий буфер ацетонитрил – метанол – 0.65 мМ водный раствор ацетата аммония (соотношение компонентов в % – 15:15:70), изократический режим, скорость потока элюента 1 мл/мин. Объем вводимой пробы составлял 20 мкл, ввод пробы осуществляли с помощью автосамплера. Масс-спектрометр работал в режиме электрораспылительной ионизации с регистрацией положительных ионов. Условия работы источника ионов: температура 500 °С, напряжение на капилляре (IS) — 5.5 кВ, давление газа на небулайзере (Gas 1) 50 psi, давление осушающего газа (Gas 2) 50 psi, давление газа-завесы (CUR) 25 psi. Программа обработки данных Analyst 1.5.2 (Applied BioSystem).

2. Исследование баклофена спектроскопическими, хроматографическими и тандемными методами

2.1 Изучение спектральных характеристик субстанции баклофена

В ИК-спектре баклофена в области от 700 до 2000 см⁻¹ в дисках с калия бромидом (2 мг/400 мг KBr) обнаружены следующие полосы поглощения, ν max, см⁻¹: 830, 1095, 1374, 1398, 1497, 1534, 1575, 1616 (рис. 5), что совпадает с литературными данными. В УФ-спектре раствора баклофена в 0.1М хлороводородной кислоты в диапазоне 210-350 нм имеются 4 максимума поглощения, нм: 220, 259, 266, 274.

2.2 Изучение хроматографических характеристик баклофена различными методами

Для последующей разработки методик определения баклофена в биологических объектах различными хроматографическими методами (ГХ/МС, ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ/МС-МС) необходимо провести подбор хроматографических условий определения баклофена в модельных растворах баклофена.

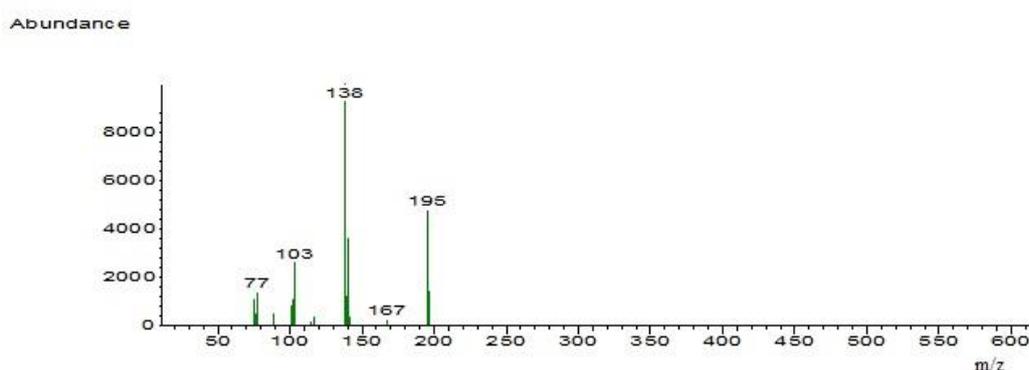
2.2.1 Исследование баклофена методом ТСХ

При исследовании баклофена методом хроматографии в тонком слое сорбента предпочтительными оказались системы растворителей н-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:1) и метанол – 25 % раствор аммиака (100:1.5), т.к. в этих системах значения R_f баклофена находятся в пределах 0.68-0.77. Наиболее

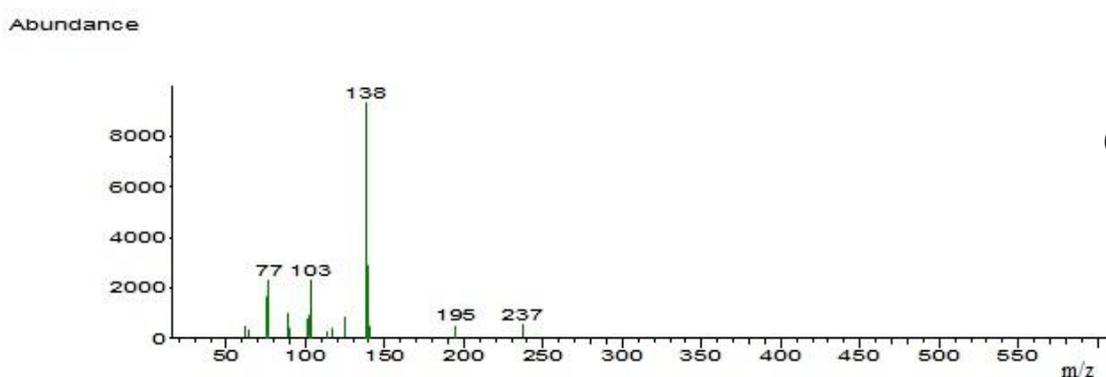
чувствительным детектором для проявления баклофена на хроматограмме является 0.5% раствор нингидрина в 10% уксусной кислоте (предел обнаружения – 10 мкг).

2.2.2 Исследование баклофена методом ГХ/МС

При газохроматографическом методе определения происходит детектирование не самого баклофена, а его производного, 4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона, образующегося при нагревании баклофена выше 117-118 °С за счет внутримолекулярной дегидратации и возникновения 5-членного N-содержащего гетероцикла пирролидина. Поиск целевого соединения на хроматограмме проводили по характеристическим ионам. В качестве характеристических ионов для 4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона были выбраны ионы с m/z 138, 195, 103, являющиеся наиболее интенсивными в масс-спектре этого соединения (рис. 2а). При исследовании этанольного раствора баклофена время удерживания 4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона составило 7.36 мин, минимально определяемая концентрация – 100 мг/дм³.



а



б

Рис. 2. Масс-спектры 4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона (а), N-ацетил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона (б)

Для улучшения хроматографических характеристик баклофена проводили его дериватизацию с уксусным ангидридом с образованием N-ацетил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона. При газохроматографическом определении баклофена в виде ацетилированного производного (N-ацетил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона) минимально определяемая концентрация составила 5 мг/дм³, время удерживания – 7.57 мин. Количественный расчет проводили в режиме селективного ионного мониторинга по наиболее интенсивному характеристическому иону 4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона и N-ацетил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона (m/z 138).

2.2.3 Исследование баклофена методом ВЭЖХ-УФ

При разработке ВЭЖХ-методики определения баклофена необходимо было подобрать условия для максимального отклика системы за минимальное время анализа. С этой целью осуществляли варьирование состава подвижной фазы (ПФ). Выбор состава ПФ был основан на кислотно-основных свойствах баклофена. Для получения оптимальных параметров удерживания необходимо создание такого значения рН подвижной фазы, при котором молекулы данного вещества будут находиться преимущественно в одной ионной форме. С целью стабилизации значения рН водного компонента ПФ использовали: раствор *o*-фосфорной кислоты, рН от 1.8 до 5.5; раствор гидрофосфата калия с *o*-фосфорной кислотой, рН от 1.8 до 5.5; фосфатный буферный раствор, рН 8.0; раствор триэтиламина, рН 9.5 и 7.5.

ВЭЖХ-анализ проводили в диапазоне рН 1.8-9.5, соответствующем рабочему диапазону большинства неполярных колонок для обращено-фазового варианта жидкостной хроматографии. Установлено, что спектр водного раствора баклофена не изменяется в исследуемом диапазоне рН 1.5-10 (рис. 3), при использовании подвижных фаз с рН 1.8-5.5 время удерживания баклофена и величина аналитического сигнала практически не изменяются в зависимости от состава ПФ и величины рН.

На рис. 4 приведена хроматограмма раствора баклофена, полученная в обращено-фазовом варианте метода жидкостной хроматографии с использованием триэтиламина в качестве модификатора ПФ.

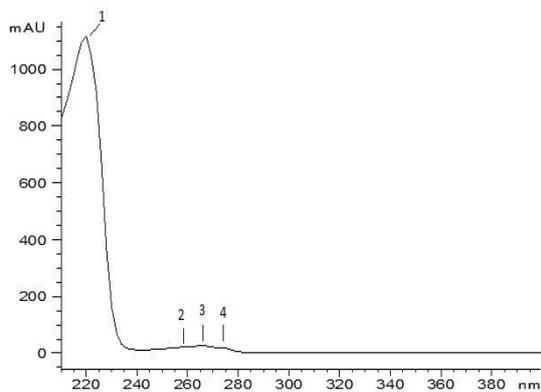


Рис. 3. УФ-спектр раствора баклофена, С=10 мкг/мл, (максимумы поглощения, нм: 1 – 220; 2 – 259; 3 – 266; 4 – 274)

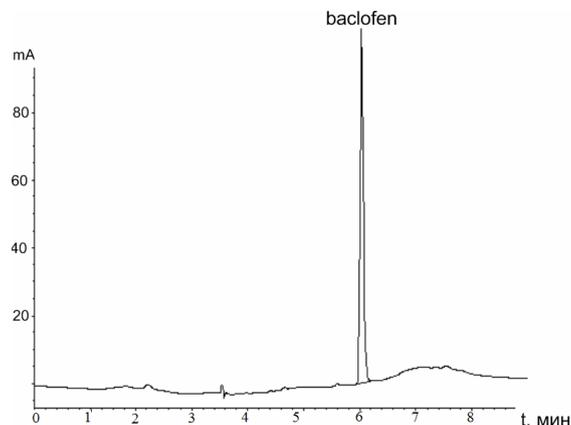


Рис. 4. ВЭЖХ-хроматограмма баклофена, длина волны 220

При использовании фосфатного буферного раствора с рН 8.0 время удерживания баклофена совпадает (с учетом погрешности) с временем удерживания при рН<7. Величина аналитического сигнала незначительно увеличивается при высоких концентрациях по сравнению с данными, полученными для рН<7.

При использовании в качестве модификатора водного компонента ПФ раствора триэтиламина с рН 9.5 наблюдается увеличение аналитического сигнала примерно в 2 раза по сравнению с величиной аналитического сигнала для ПФ с рН<7. Время удерживания баклофена увеличилось на 1 мин.

На основании сравнения зависимости площади пика от концентрации установлено, что наибольшая чувствительность наблюдается при использовании в качестве модификатора ПФ раствора триэтиламина. Это может быть обусловлено межмолекулярным взаимодействием между молекулами триэтиламина и активными центрами неподвижной фазы.

Линейность методики доказана в диапазоне концентраций от 0.5 до 50 мг/дм³. Уравнение зависимости аналитического сигнала от концентрации баклофена имеет вид $y = 32.9867x - 22.2277$, коэффициент корреляции 0.9995. Правильность и повторяемость методики устанавливали методом «введено-найдено» по девяти концентрационным уровням градуировочного графика в трех параллельных измерениях. Отклонение от истинного значения составляет от 1.2 до 5.0%.

Таким образом, установлено, что наиболее приемлемым вариантом определения баклофена методом ВЭЖХ на неполярных колонках является использование 10 мМ раствора триэтиламина в качестве водного компонента подвижной фазы. В дальнейшем полученные условия проведения ВЭЖХ-анализа были использованы при разработке методики пробоподготовки биожидкостей (мочи) с целью определения баклофена.

2.2.4 Исследование баклофена методом ВЭЖХ-МС/МС

Для токсикологической оценки важно определение концентрации баклофена в крови. Учитывая весьма незначительные его концентрации, чувствительности метода ВЭЖХ/УФ недостаточно для ее определения, поэтому была разработана методика на основе ВЭЖХ с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Условия масс-фрагментации баклофена были подобраны с помощью программы обработки данных Analyst 1.5.2 (Applied BioSystem). Масс-спектр фрагментов иона-предшественника баклофена (m/z 214) приведен на рис. 5.

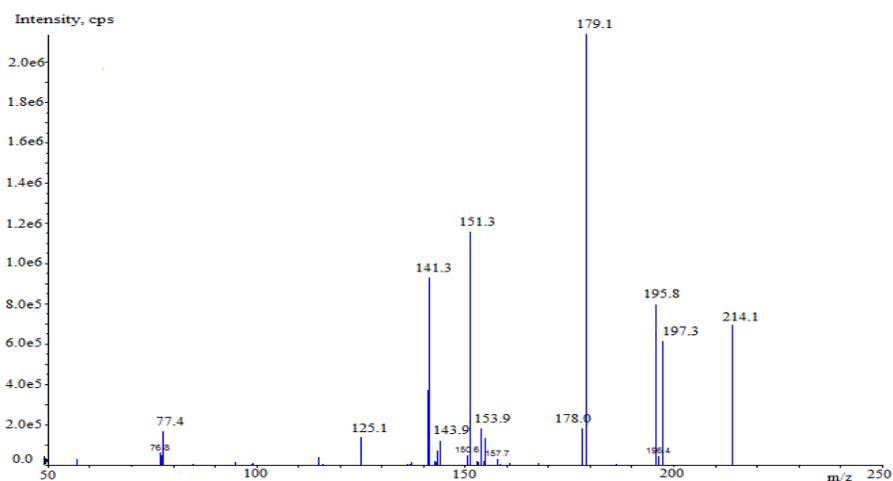


Рис. 5. Масс-спектр MS² баклофена (ион-предшественник 214)

Определение концентрации баклофена проводили по наиболее интенсивным откликам ионов с m/z 151, 179, 197. При выбранных параметрах анализа и масс-фрагментации время удерживания баклофена составило 3.58 мин. Минимально определяемая концентрация баклофена составила 1 мкг/дм³ (нг/мл). Метод ВЭЖХ/МС-МС с применением выбранных условий был использован для разработки методики определения баклофена в крови.

3. Разработка методик идентификации и количественного определения баклофена в биологических объектах

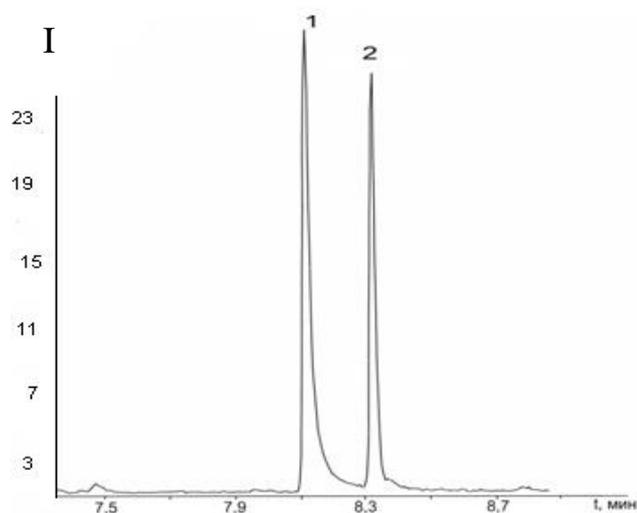
3.1 Обнаружение баклофена при использовании методик скрининга методом ГХ/МС

Методики ГХ/МС-скринингов, используемых в химико-токсикологическом анализе (ХТА) и судебно-химических исследованиях (СХИ) для обнаружения ряда наркотических средств и лекарственных веществ в биологических объектах, не адаптированы для обнаружения баклофена. В связи с этим, практическое значение имеет оценка возможности определения баклофена с применением рассматриваемых методик.

3.1.1 Обнаружение баклофена при использовании методики скрининга мочи методом ГХ/МС после ацетилирования

Пробоподготовку образцов мочи осуществляли в судебно-химическом отделении ККБСМЭ по методике скрининга мочи методом ГХ/МС, широко применяемой в судебно-химических и химико-токсикологических лабораториях. Для этого по 1 мл мочи помещали в стеклянные флаконы, прибавляли по каплям 1 мл концентрированной хлороводородной кислоты (до рН 2.0), флаконы закрывали резиновыми пробками и фиксировали металлическими фиксаторами. Затем флаконы помещали в кипящую водяную баню и выдерживали 30 мин. После охлаждения жидкости до комнатной температуры, для осаждения белков прибавляли 3-4 капли трихлоруксусной кислоты, центрифугировали, отделяли надосадочный слой и дважды экстрагировали 2 мл гексана для удаления неполярных липофильных веществ. Затем водный слой отделяли и нейтрализовали до рН 6.5-7.0 порошком гидрокарбоната натрия. Прибавляли 1-2 капли 25%-го раствора аммиака до рН 8.5-9.0 и экстрагировали 2 мл смеси бутанол - хлороформ (1:9) два раза по 10 мин. Полученные органические извлечения отделяли, объединяли и выпаривали досуха во флаконе в токе теплого воздуха. К сухому остатку добавляли по 0.2 мл смеси уксусного ангидрида с пиридином (3:2), флакон закрывали, встряхивали в течение 30 с и помещали в термостат при 70 °С в течение 30 мин. По окончании реакции избыток реактивов выпаривали досуха в токе воздуха при температуре не выше 50 °С. Сухой остаток растворяли в 0.2 мл этилацетата и исследовали методом ГХ/МС.

При определении баклофена методом ГХ/МС в модельных образцах мочи после дериватизации с уксусным ангидридом, обнаружено, что баклофен ацетируется не полностью, и на хроматограмме наблюдается два пика: 4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинон и N-ацетил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинон (рис. 6). При этом соотношение площадей данных пиков являлось постоянным.



1 – 4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинон; 2 – N-ацетил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинон

Рис. 6. Хроматограмма экстракта мочи, содержащей баклофен (с=100 мкг/мл), по полному ионному току

При этом минимальная концентрация баклофена в моче, при которой на хроматограмме идентифицировали хотя бы один из артефактов баклофена, составила 50 мг/дм³. Таким образом, данная методика может быть использована для обнаружения, идентификации и полуколичественного определения баклофена в моче.

3.1.2 Обнаружение баклофена во внутренних органах методом ГХ/МС с применением методики пробоподготовки QuEChERS

Для пробоподготовки внутренних органов (печени, стенки желудка) использовали методику QuEChERS (по первым буквам Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe – Быстрый, Легкий, Дешевый, Эффективный, Крепкий, Надежный), оптимизированную для судебно-химических исследований органов на наличие лекарственных и наркотических веществ с применением наборов VetexQ Tox.

Пробоподготовку внутренних органов трупа (печени, стенки желудка) проводили в лаборатории судебно-химического отделения ККБСМЭ. 5 г исследуемой печени или стенки желудка гомогенизировали, помещали в полипропиленовую пробирку для экстракции объемом 50 мл из набора VetexQ Tox, содержащую $MgSO_4$ и $NaCl$ для создания буферной системы, прибавляли 5 мл ацетонитрила, перемешивали и встряхивали в течение 1 мин, затем добавляли 0.1 мл концентрированной хлороводородной кислоты. Полученную смесь обрабатывали на ультразвуковой ванне в течение 20 мин и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочный слой в количестве 3-3.5 мл переносили в полипропиленовую пробирку для очистки экстракта объемом 15 мл из набора VetexQ Tox, содержащую $MgSO_4$ и сорбент C_{18} . Смесь встряхивали в течение 5 мин и центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин. По 1 мл экстрактов выпаривали досуха во флаконе, к сухим остаткам добавляли по 0.2 мл смеси уксусного ангидрида с пиридином (3:2), флаконы закрывали, встряхивали в течение 30 с и помещали в термостат при $70\text{ }^{\circ}C$ в течение 30 мин. По окончании реакции избыток реактивов выпаривали досуха в токе воздуха при температуре не выше $50\text{ }^{\circ}C$. Сухие остатки растворяли в 0.2 мл этилацетата и исследовали методом ГХ/МС.

Как и в случае определения баклофена по методике скрининга мочи, при исследовании экстрактов внутренних органов методом ГХ/МС после ацетилирования на хроматограмме идентифицировали два пика: 4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинон и N-ацетил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинон. Методика экстракции из внутренних органов с использованием наборов VetexQ Tox и анализ экстрактов методом ГХ/МС подходит для для обнаружения, идентификации и полуколичественного определения баклофена в органах.

3.2 Количественное определение баклофена в моче методом ВЭЖХ-УФ

Для количественного определения баклофена в моче была разработана методика с использованием ВЭЖХ-УФ на основе рабочих условий определения баклофена в модельных растворах. Пробоподготовку образцов мочи для исследования методом ВЭЖХ проводили в лаборатории судебно-химического отделения ККБСМЭ следующим образом: к 1 мл мочи прибавляли 1 мл ацетонитрила (Pancreas, Испания), выдерживали в ультразвуковой ванне

(Ферропласт Медикал, Россия) 15 мин при температуре 40 °С и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин (центрифуга типа ОПн-8, ротор РУ180Л, Россия). Затем для получения эффекта высаливания и очистки от эндогенных соединений добавляли по 0.05 г кристаллического хлорида натрия и сульфата натрия, 0.1 г сорбента C₁₈ (Separon SGX RPS, 60 мкм, с привитой фазой C18) и 1 мл гексана (ХЧ), помещали в шейкер на 15 мин, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. После этого слой гексана удаляли пипеткой, а оставшуюся жидкость пропускали через бумажный фильтр, смоченный дистиллированной водой, и выпаривали в токе теплого воздуха. Сухие остатки растворяли в 0.5 мл 0.1М хлороводородной кислоты и исследовали методом ВЭЖХ-УФ. При превышении концентрации баклофена верхней границы градуировочного графика в реальных образцах мочи применяли прием разбавления.

Специфичность методики подтверждали, исследуя образцы мочи, содержащей баклофен, и в его отсутствии. Идентификацию пика баклофена проводили по времени удерживания и УФ-спектру. Время удерживания баклофена составило 6.18 мин (рис. 7).

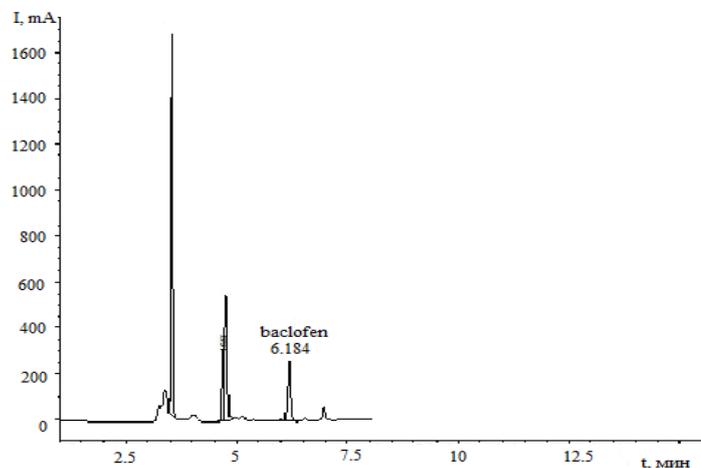


Рис. 7. Хроматограмма образца мочи с добавлением баклофена, концентрация баклофена 20 мкг/мл

Проверку пригодности хроматографической системы проводили путем оценки не менее 3-х хроматограмм. Среднее число теоретических тарелок составило 10750, фактор асимметрии пика баклофена 1,13, что свидетельствует о высокой эффективности хроматографической системы. *Линейность методики* доказана в диапазоне концентраций от 2 до 150 мг/дм³. Уравнение зависимости аналитического сигнала от концентрации баклофена имеет вид $y = 29.078x - 20.233$, коэффициент корреляции 0.99966.

Для оценки *повторяемости методики* проводили 5-кратное количественное определение баклофена в модельном образце мочи, содержащем 70 мг/дм³ баклофена. *Правильность методики* устанавливали методом «введено-найдено» по шести концентрационным уровням градуировочного графика в трех параллельных измерениях. Согласно полученным данным, отклонение от истинного значения составляет 0.3-10%.

Предел количественного определения баклофена в моче составил 2 мг/дм³, который рассчитывали как наименьшую концентрацию баклофена, при которой отношение сигнал – шум составляло 10:1.

Таким образом, разработанная ВЭЖХ-методика количественного определения баклофена в моче характеризуется специфичностью, линейностью, правильностью и повторяемостью. Предложенная методика пригодна для использования в химико-токсикологическом анализе.

3.3 Количественное определение баклофена в крови методом ВЭЖХ-МС/МС

Для количественного определения баклофена в крови, учитывая незначительные его концентрации, была разработана методика ВЭЖХ с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Определение количества баклофена проводили по методу внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта был выбран фенибут ввиду схожести его химической структуры с баклофеном, который отличается от фенибута наличием атома хлора.

Пробоподготовку образцов крови для исследования методом ВЭЖХ-МС/МС проводили следующим образом: к 1 мл крови прибавляли 50 мкл водного раствора внутреннего стандарта фенибута (концентрация 0.001 г/дм³, РУП «БЕЛМЕДПРЕПАРАТЫ»), 2-3 капли 50%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, выдерживали на шейкере (S-3.02M, Латвия) 15 мин, затем центрифугировали в течение 15 мин при скорости 4000 об/мин (центрифуга типа ОПн-8, ротор РУ180Л, Россия). 20 мкл надосадочного слоя переносили в виалу и добавляли 980 мкл дистиллированной воды.

При параметрах анализа, приведенных выше, время удерживания баклофена составило 3.59 мин (по m/z 151, 179, 197), а фенибута – 2.95 мин (по m/z 163, 145, 117) (рис. 8).

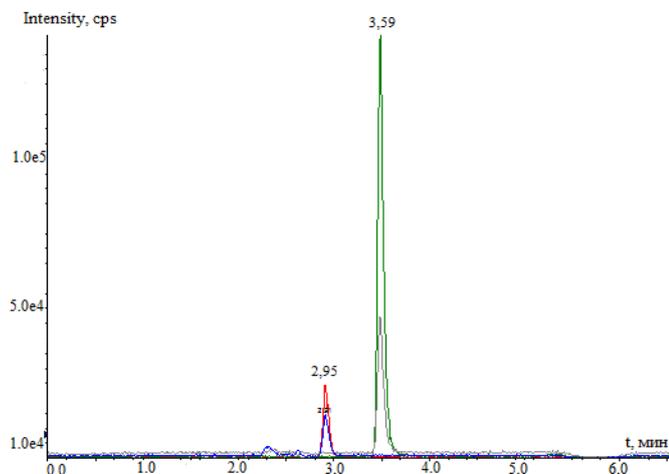


Рис. 8. MRM хроматограмма образца крови с добавлением баклофена, концентрация баклофена 250 нг/мл

Были определены коэффициенты чувствительности по характеристическим фрагментам баклофена и фенибута, с помощью которых проводили количественный расчет. Методика отличается высокой *специфичностью*, это подтверждается отсутствием пиков эндогенных соединений в месте элюирования баклофена.

Линейность градуировочного графика для определения баклофена в крови доказана в диапазоне

концентраций от 50 до 4000 мкг/дм^3 . Уравнение зависимости аналитического сигнала от концентрации баклофена в крови имеет вид $y = 0.0232 x + 0.0931$, коэффициент корреляции 0.9997. *Предел обнаружения* баклофена в крови составил 5 мкг/дм^3 . *Оценку правильности и повторяемости методики* проводили методом «введено-найдено» по одиннадцати концентрационным уровням градуировочного графика в трех параллельных измерениях. Согласно полученным данным, отклонение от истинного значения находится в пределах до 5%.

Таким образом, разработанная методика количественного определения баклофена в крови характеризуется экспрессностью, специфичностью, линейностью, правильностью, повторяемостью, низким пределом количественного определения.

3.4 Разработка схем судебно-химического и химико-токсикологического исследования при отравлении баклофеном

Общая схема исследования биологических объектов при ненаправленном анализе на наличие баклофена:



3.5 Применение разработанных методик для определения баклофена в реальных образцах биологических объектов

Разработанные методики применяли для определения баклофена в реальных образцах крови и мочи, полученных от лиц, поступавших в течение 2013 г в отделение острых отравлений Красноярской межрайонной клинической больницы скорой медицинской помощи №6 им. Н.С. Карповича (КМКБСМП) с предварительным диагнозом отравление лекарственными средствами и клиническими симптомами, характерными для отравления баклофеном, а также от трупов, поступивших в ККБСМЭ с подозрением на отравление баклофеном.

За 2013 г в отделении острых отравлений ГК БСМП зафиксирован 21 случай отравления баклофеном, что подтверждено результатами химико-токсикологического исследования крови и мочи пациентов, а также клиническими признаками, характерными для отравления баклофеном. Концентрация баклофена в моче пациентов варьировалась в диапазоне 3.3-549.9 мг/дм³, а в крови – в диапазоне 32-2530 мкг/дм³. Концентрация баклофена в двух образцах крови соответствует токсической. Большая разница в определяемых концентрациях баклофена в крови и моче подтверждает необходимость применения ВЭЖХ-методик с различными способами детектирования.

В ноябре 2013 г. в ККБСМЭ зафиксирован случай смертельного отравления баклофеном с целью суицида. Для исследования в судебно-химическое отделение ККБСМЭ были доставлены кровь и внутренние органы (печень, желудок) от трупа гражданки В. 1988 г.р., обнаруженной в ванне без признаков насильственной смерти с выраженными гнилостными изменениями. По обстоятельствам, выпила 50 таблеток баклофена по 25 мг.

Исследование внутренних органов трупа проводили по методике, описанной в п.п. 3.1.2. При исследовании экстрактов органов методом ГХ/МС на хроматограмме идентифицировали два пика, соответствующие маркерам присутствия баклофена 4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинону и N-ацетил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинону, которые являются маркерами присутствия баклофена.

Исследование крови гр. В. на наличие баклофена проводили методом ВЭЖХ-МС/МС по методике, описанной в п.п. 3.3. Концентрация баклофена в крови гр. В. была определена после разбавления исследуемой крови и составила 6650 нг/мл (6.65 мкг/мл), что превышает токсическую концентрацию, из чего можно сделать вывод, что смерть наступила вследствие острого отравления баклофеном.

Наличие случаев отравлений баклофеном, в том числе с летальным исходом, обуславливает необходимость запретить отпуск препарата «Баклофен» без рецепта врача. Таким образом, успешное применение разработанных методик для определения баклофена в биологических объектах показало возможность их использования в химико-токсикологическом и судебно-химическом анализе.

ВЫВОДЫ

1. Впервые изучены условия хроматографического определения баклофена и разработаны методики определения баклофена в модельных растворах методами ГХ/МС, ВЭЖХ/УФ и ВЭЖХ-МС/МС. Показана необходимость дериватизации баклофена при определении его методом ГХ/МС. Изучено влияние рН на определение баклофена методом ВЭЖХ/УФ. Подобраны параметры МRM-режима при определении баклофена методом ВЭЖХ-МС/МС.

2. Показана возможность применения ГХ/МС-методик, используемых в химико-токсикологическом анализе и судебно-химических исследованиях, для

исследования биологических объектов (мочи, внутренних органов) на наличие баклофена. Однако рассмотренные методики характеризуются высокими минимально определяемыми концентрациями и не могут быть применены для количественного анализа в связи с образованием двух производных баклофена с переменным соотношением.

3. Впервые предложены алгоритмы пробоподготовки биологических жидкостей (крови, мочи) для определения баклофена методами ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС, отличающиеся дешевизной и экспрессностью.

4. Разработаны методики идентификации и количественного определения баклофена в крови методом ВЭЖХ-МС/МС и в моче методом ВЭЖХ-УФ. Методики характеризуются специфичностью (подтверждено отсутствие влияния эндогенных соединений), линейностью (коэффициенты корреляции составили 0.9997 для крови, 0.99966 для мочи), правильностью (отклонение от истинного значения составило от 0.7 до 10% для мочи, до 5% для крови) повторяемостью, низкими пределами количественного определения (5 мкг/дм³ для крови, 2 мкг/дм³ для мочи).

5. Разработанные методики определения баклофена апробированы в практике судебно-химического и химико-токсикологического анализа на реальных образцах крови, мочи и органов, полученных от лиц с подозрением на отравление баклофеном. Подтверждена необходимость применения двух различных вариантов детектирования в ВЭЖХ при определении баклофена в крови и моче в связи с большой разницей определяемых концентраций баклофена.

6. Впервые составлена схема судебно-химического и химико-токсикологического исследования биологических объектов на наличие баклофена. Разработано информационное письмо для определения баклофена в биологических объектах.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Дукова, О.А. Определение баклофена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / О.А. Дукова, М.Р. Азнаева, О.П. Калякина // Сборник материалов VI-й Всероссийской научно-технической конференции студентов,

аспирантов и молодых ученых [Электронный ресурс] / отв. ред. О.А.Краев. – Красноярск: Сиб. федер.ун-т, 2011.

2. Дукова, О.А. Определение баклофена хроматографическими методами / М.Р. Азнаева, О.А. Дукова, О.П. Калякина // Менделеев-2012. Аналитическая химия. Шестая Всероссийская конференция молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием. Тезисы докладов. – СПб.: Издательство Соло, 2012. – С. 131-133.

3. Дукова, О.А. Использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для количественного определения баклофена в крови / М.Р. Азнаева, О.А. Дукова, О.П. Калякина // «Тенденции развития биологии, химии, физики»: материалы международной заочной научно-практической конференции. (06 марта 2012 г.) – Новосибирск: Изд. «Сибирская ассоциация консультантов», 2012. – С. 76-79.

4. Дукова, О.А. Обнаружение и количественное определение баклофена в моче при химико-токсикологическом исследовании / О.А. Дукова, Е.А. Краснов, А.А. Ефремов, Е.В. Суворова. // Сборник тезисов конференции АСТЕ'2013. – М.: Издательская группа «Граница». – 2013. – С. 61-63.

5. Дукова, О.А. Определение баклофена в моче при химико-токсикологическом исследовании / О.А. Дукова, Е.А. Краснов, А.А. Ефремов, Т.Г. Шиврина, Е.В. Суворова. // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2014. – №3. – С. 28-33.

6. Дукова, О.А. Разработка ВЭЖХ-методики определения баклофена / О.А. Дукова, Е.А. Краснов, А.А. Ефремов // **Химико-фармацевтический журнал.** – 2014. – Т. 48, №9. – С. 82-85.

7. Дукова, О.А. Случай смертельного отравления баклофеном / О.А. Дукова, А.А. Покровский, А.Б. Мелентьев, Е.А. Краснов, Е.В. Суворова, А.А. Ефремов // **Судебно-медицинская экспертиза.** – 2015. – №1. – С. 35-39.

8. Dukova, O.A. Identification and Quantitative Determination of Baclofen in Human blood by HPLC with Mass Spectrometry Detection // O.A. Dukova, M.U. Kotlovsky, A.A. Pokrovsky, E.V. Suvorova, T.G. Shivrina, E.A. Krasnov, A.A. Efremov /

Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: **Biomedical Chemistry**. – 2015. – Vol. 9, №2. – P. 137-142.

9. Дукова, О.А. Возможности использования различных вариантов ВЭЖХ при определении баклофена в биологических объектах / О.А. Дукова, Е.А. Краснов, М.Ю. Котловский, Е.В. Суворова, А.А. Ефремов // **Журнал Сибирского федерального университета. Химия**. – 2015. – Т. 8, №1. – С. 70-77.

10. Дукова, О.А. Хромато-масс-спектрометрическое определение баклофена в биологических объектах / Е.А. Краснов, О.А. Дукова, А.А. Ефремов, А.А. Блинникова // Тезисы докладов Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии» с международным участием, посвященная памяти проф. М.С. Вигдергауза. – Самара: Изд-во ООО «Порто-принт». – 2015. – С. 225.

Подписано в печать 21.11.2016. Тираж 100 экз.
Кол-во стр. 24. Заказ 127
Бумага офсетная. Формат А5. Печать RISO.
Отпечатано в типографии ООО «СПБ Графика»
634034, г. Томск, ул. Усова 4 а, оф. 150.
Тел. 89039547361