

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

ДУКОВА ОЛЬГА АЛЕКСАНДРОВНА

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

02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук
профессор Ефремов А.А.

Красноярск 2016

Оглавление

Список сокращений	4
Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	11
1.1 Общая характеристика баклофена, физико-химические свойства	11
1.2 Фармакодинамика и фармакокинетика баклофена	14
1.3 Побочное действие и немедицинское применение баклофена	16
1.4 Методы обнаружения и количественного определения баклофена в биологических объектах	18
1.4.1 Спектроскопические методы определения баклофена	19
1.4.2 Хроматографические методы определения баклофена	20
1.5 Скрининг на наркотические и лекарственные вещества в судебно- медицинской экспертизе и химико-токсикологическом анализе	24
Глава 2. Объекты, методы исследования и аппаратура	28
2.1 Объекты исследования	28
2.2 Методы исследования, аппаратура и условия	29
Глава 3. Исследование баклофена спектроскопическими, хроматографическими и тандемными методами	36
3.1 Изучение спектральных характеристик субстанции баклофена	36
3.2 Изучение хроматографических характеристик баклофена различными методами	38
3.2.1 Исследование баклофена методом ТСХ	38
3.2.2 Исследование баклофена методом ГХ/МС	40
3.2.3 Исследование баклофена методом ВЭЖХ-УФ	45
3.2.4 Исследование баклофена методом ВЭЖХ-МС/МС	50
Глава 4. Разработка методик идентификации и количественного определения баклофена в биологических объектах	55

4.1 Обнаружение баклофена при использовании методик скрининга методом ГХ/МС	55
4.1.1 Обнаружение баклофена при использовании методики скрининга мочи методом ГХ/МС после ацетилирования	55
4.1.2 Обнаружение баклофена во внутренних органах методом ГХ/МС с применением методики пробоподготовки QuEChERS	57
4.2 Разработка методики количественного определения баклофена в моче методом ВЭЖХ-УФ	60
4.3 Разработка методики количественного определения баклофена в крови методом ВЭЖХ-МС/МС	67
4.4 Разработка схем судебно-химического и химико-токсикологического исследования при отравлении баклофеном	74
4.5 Применение разработанных методик для определения баклофена в реальных образцах биологических объектов	76
Выводы	80
Благодарности	82
Список литературы	83
Приложения	98
Приложение 1	99
Приложение 2	109
Приложение 3	110
Приложение 4	111
Приложение 5	113

Список сокращений

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием

ГАМК - γ -аминомасляная кислота

ГХ/МС – газовая хроматография с масс-селективным детектором

ГСО – государственный стандартный образец

ГФ – государственная фармакопея

ИК-спектр – инфракрасный спектр

ЛС – лекарственное средство

МС – масс-спектрометрия

ПФ – подвижная фаза

СМЭ – судебно-медицинская экспертиза

СХИ – судебно-химическое исследование

Т. пл. – температура плавления

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ-спектр – ультрафиолетовый спектр

ХТА – химико-токсикологический анализ

ЦНС – центральная нервная система

Введение

Актуальность темы. Проблема немедицинского употребления лекарств последнее десятилетие стала одной из самых острых. На эту тему ведутся споры, запрещают продажу некоторых препаратов без рецепта. Но желающих получить «аптечный наркотик» по-прежнему остается значительное количество [22].

Особую озабоченность вызывает злоупотребление лекарственными препаратами, оказывающими обезболивающее, а также снотворное и седативное действие. Свободный доступ к таким веществам в аптечной сети способствует распространению токсикомании. По данным статистических исследований, повышение спроса на подобные препараты привело к увеличению числа острых отравлений, в том числе и со смертельным исходом. К их числу следует отнести буторфанол, донормил, кетанал, имован, феназепам, амитриптилин, декстрометорфан. При этом круг таких препаратов постоянно расширяется, сюда входит такое лекарственное средство как баклофен. В связи с этим чаще стали появляться сообщения об отравлениях баклофеном [8, 45, 63, 80, 91-92].

В 2012 г в отделении острых отравлений КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н.С. Карповича» (КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича») зафиксировано 15 случаев острых отравлений баклофеном, в 2011 г – 16 случаев, в 2010 г – 23 случая.

Наличие случаев отравления баклофеном обуславливает необходимость изучения данного соединения в химико-токсикологическом и судебно-химическом аспекте.

Баклофен по своей химической структуре является производным γ -аминомасляной кислоты (ГАМК). Основное проявление его фармакологической активности – антиспастическое действие, уменьшение

мышечного напряжения; кроме того, баклофен оказывает также анальгезирующее действие [25].

Для анализа баклофена используют спектроскопические и хроматографические методы: метод газовой хроматографии [64], газовой хромато-масс-спектрометрии [116] и высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым [79, 106], флуоресцентным [69], масс-селективным [73, 77] или электрохимическим детекторами, а также капиллярный электрофорез [54, 59].

Вместе с тем, анализ литературных данных показал, что систематического исследования баклофена в химико-токсикологическом и судебно-химическом плане не проводилось.

Разработанные методики определения баклофена предусматривают использование дорогостоящих и труднодоступных реагентов и детекторов и сложны для использования при рутинном анализе.

Для подтверждения диагноза отравления баклофеном необходимо иметь надежные, достоверные и доступные методы его качественного и количественного определения в биологических объектах.

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 tandemными 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.

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.

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

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 (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 МБУЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи №6 им. Н.С. Карповича» (г. Красноярск). Выражаем искреннюю благодарность сотрудникам указанных учреждений.

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.

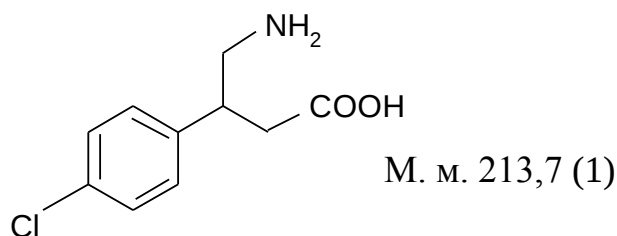
Первая глава представляет собой обзор литературы по физико-химическим свойствам баклофена, его фармакологическим аспектам (фармакодинамика, фармакокинетика, побочное действие баклофена), его немедицинскому применению. Рассмотрены методы обнаружения и количественного определения баклофена в биологических объектах. На основании обзора литературы сформулированы задачи исследования. Глава 2 содержит краткое описание объектов и применяемых методов анализа. Главы 3 и 4 посвящены результатам экспериментального исследования спектроскопических и хроматографических характеристик баклофена, а также разработке методик качественного и количественного определения баклофена в биологических объектах.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика баклофена, физико-химические свойства

Баклофен – лекарственный препарат, относящийся к группе веществ, влияющих на нервно-мышечную передачу. Синонимы – Лиорезал, Баклосан, Спастин и др. [5] Основное проявление фармакологической активности баклофена – антиспастическое действие. Он оказывает также миорелаксирующее и анальгезирующее действие на организм, угнетает моно- и полисинаптические рефлексy в спинном мозге, уменьшает тонус мышц [25, 43].

Активным действующим веществом в препарате «Баклофен» является 4-амино-3-(4-хлорфенил)-бутановая кислота – баклофен (1). По структуре баклофен является производным γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) и сходен с аминалоном и фенибутом. От последнего отличается наличием атома хлора в пара-положении фенильного ядра [4, 11, 21, 47].



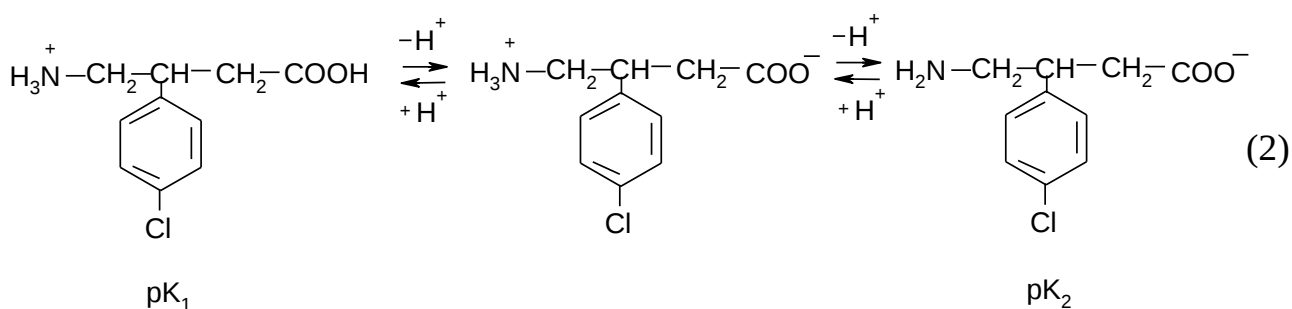
Баклофен представляет собой порошок белого цвета. Мало растворим в воде, очень мало растворим в 96% этаноле, практически не растворяется в ацетоне, диэтиловом эфире и в хлороформе [31, 67]. Аминогруппа ионизирована в несколько меньшей степени, чем карбоксильная, поэтому водный раствор баклофена имеет слабокислый характер. Температура плавления баклофена 207 °C [58, 62].

Форма выпуска препарата – таблетки с дозировкой препарата 10 и 25 мг баклофена (производитель Polpharma, Польша) [33], раствор для интратекального введения в ампулах по 1 (0,05 мг/мл), 2 (0,5 мг/мл) и 5 (2

мг/мл) мл (производитель NOVARTIS PHARMA STEIN, Швейцария) [12, 25, 43].

В связи с наличием в структуре карбоксильной и аминогрупп, баклофен проявляет кислотные и основные свойства ($pK_1=3,9$; $pK_2=9,6$). Растворяется в разбавленных минеральных кислотах и в разбавленных щелочах [62, 118].

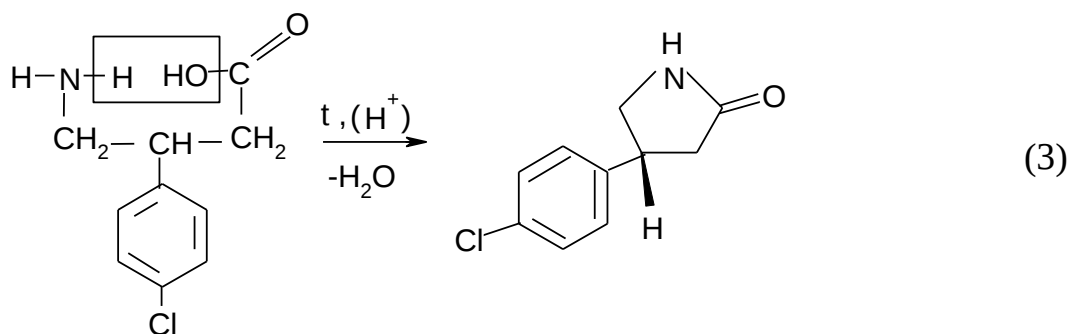
В зависимости от величины pH баклофен может выступать донором или акцептором электронов (2).



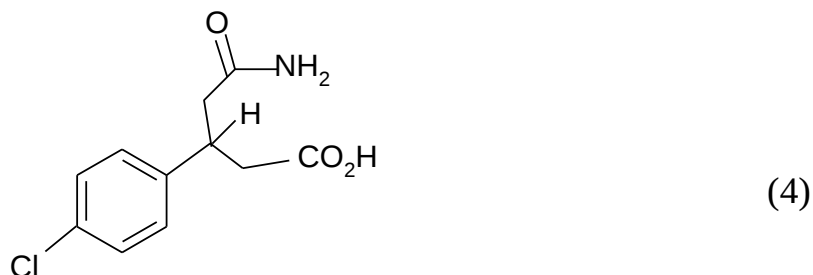
При низком значении pH (ниже pK_1) почти все молекулы являются протонированными и несут положительный заряд [52].

Так как баклофен по структуре является аминокислотой, он может вступать в реакцию этерификации с образованием сложного эфира, что применяется для дериватизации баклофена в газохроматографическом анализе [30, 53].

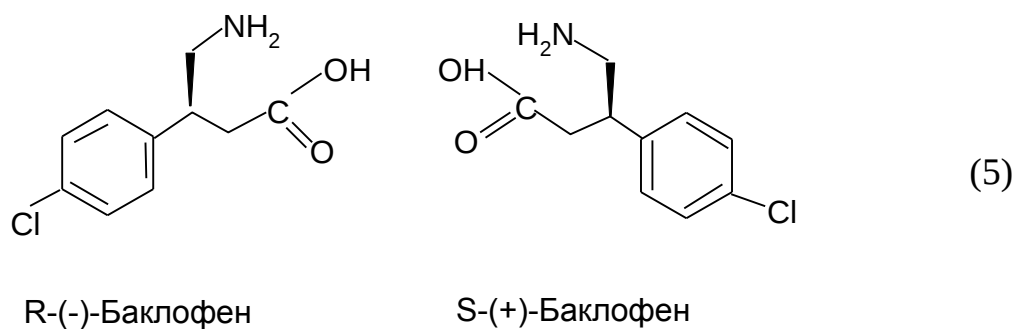
При нагревании (117-118 °C) слабокислого раствора баклофена возможно взаимодействие amino- и карбоксильной групп внутри одной молекулы, с образованием лактама 4-(4-хлорфенил)-пирролидин-2-она [31]:



В лекарственных субстанциях в незначительных количествах могут присутствовать примеси как 4-(4-хлорфенил)-пирролидин-2-он (3), так и 5-амино-3-(4-хлорфенил)-5-оксопентановой кислоты (4) [58, 123]:



В связи с наличием хирального атома углерода, у баклофена, как производного аминокислоты, имеются R- и S-энантиомеры (5) [58, 62]:



Кислотный раствор баклофена имеет три полосы поглощения в УФ области: $\lambda_{\text{макс}} = 259, 266$ и 274 нм (рис. 1) [31, 55, 67].

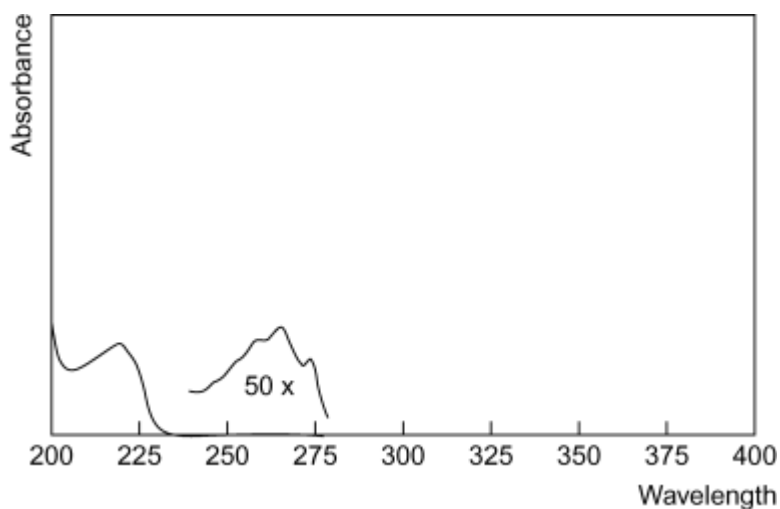


Рисунок 1 – УФ-спектр баклофена

В ИК-спектре (KBr) баклофена обнаруживаются характеристические полосы поглощения при 1527, 835, 1574, 1495, 1624, 1095 см^{-1} (рис. 2) [55, 62].

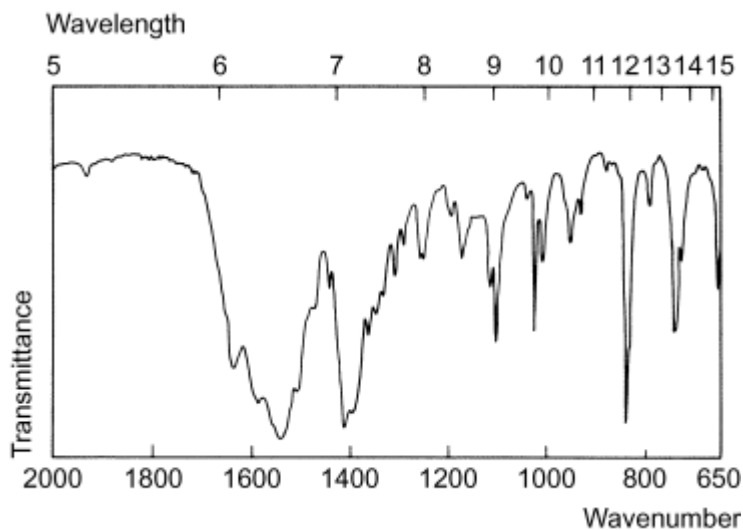


Рисунок 2 – ИК-спектр баклофена

При масс-спектрометрическом анализе баклофена наиболее интенсивные пики дают ионы массой 30, 138, 195, 140, 103, 197, 77, 196 (рис. 3) [62, 64].

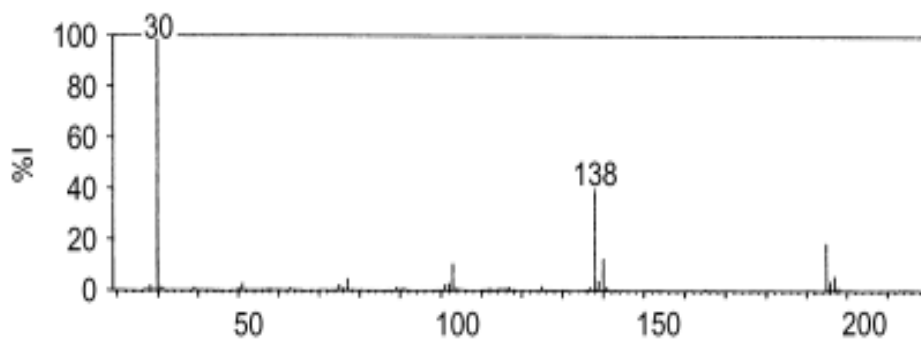


Рисунок 3 – Масс-спектр баклофена

1.2 Фармакодинамика и фармакокинетика баклофена

По своей химической структуре баклофен является производным хлорфенилмасляной кислоты (пара-хлорфенил-ГАМК), это и определяет своеобразие его фармакологических эффектов [13, 24, 25].

Применяют баклофен для уменьшения спастичности при рассеянном склерозе, при поражениях (травмы, опухоли) спинного мозга, инсульте головного мозга, церебральном параличе, воспалении мозговых оболочек, травмах головы и др. Имеются данные о применении баклофена для лечения эффективного расстройства при алкоголизме [5, 25, 43].

Баклофен – миорелаксант центрального действия, который отличается от других антиспастических средств, как по механизму действия, так и по фармакологическим свойствам.

В основе вызываемой баклофеном миорелаксации лежит воздействие преимущественно на спинальном уровне и связано с угнетением моно- и полисинаптических рефлексов, а также со снижением активности γ -мотонейронов.

При анализе нейрохимических механизмов, определяющих действие баклофена, было установлено, что препарат активирует пресинаптические ГАМК-В рецепторы. Это приводит к уменьшению выделения возбуждающих аминокислот (глутамата и аспартата), играющих важную роль в формировании спастической реакции [6, 103].

Одним из важнейших клинических преимуществ баклофена является наличие у него мощного обезболивающего эффекта. Механизм действия вовлекает два принципиальных пути подавления болевой чувствительности – опиатный и катехоламинергический: стимулируется выброс эндогенных опиатов (метэнкефалина) в стриатуме (стриатум – полосатое тело, анатомическая структура конечного мозга, относящаяся к базальным ядрам полушарий головного мозга); ГАМК-опосредованно активируется адрено- и дофаминергическая системы, причем не только на подкорковом, но и на корковом уровне [103].

Энантиомеры баклофена обладают различными свойствами. Хотя выпускают баклофен в виде рацемической смеси, только R-(–)-энантиомер баклофена стереоспецифично активен по отношению к GABA рецепторам. Установлено, что R-(–)-энантиомер в 100 раз более активен, чем S-(+)-энантиомер [81, 108, 110-113].

Фармакокинетика. Баклофен быстро и полностью всасывается из желудочно-кишечного тракта. После однократного приема внутрь 20 мг баклофена, пиковая концентрация в плазме уже через 2,5 ч составляет 0.27 мкг/мл, а терапевтическая концентрация баклофена в плазме крови – 0.2-0.6 мкг/мл. Максимальная концентрация баклофена в плазме крови (0.5-0.6 мкг/мл) достигается через 2-3 ч после приема, затем концентрация баклофена в плазме снижается и сохраняется на уровне 0.2 мкг/мл в течение 8 ч [62, 87, 129].

Изучение биотрансформации баклофена показало, что он на 30% связывается с белками плазмы, а период полувыведения его составляет в среднем 3-4 ч. Около 15% принятой дозы метаболизируется в печени путем дезаминирования. Выводится баклофен, главным образом, в неизмененном виде: через 24 ч около 80% препарата выводится через почки, 15% – в виде метаболитов, а остальная часть – с фекалиями. Около 15% введенной дозы выводится в виде основного метаболита – β -(4-хлорфенил)- γ -гидроксимасляной кислоты, – который фармакологически неактивен. После приема внутрь препарат полностью выводится из организма в течение 72 ч. Максимальная суточная доза баклофена 75 мг [72, 89, 130].

1.3 Побочное действие и немедицинское применение баклофена

Побочные действия баклофена со стороны ЦНС и периферической нервной системы проявляется в виде сонливости, головокружения (особенно в начале лечения); иногда – апатии, чувства усталости, расстройства сна, спутанности сознания; редко – эйфории, депрессии, парестезии, миалгии, мышечной слабости, атаксии, тремора, нарушения аккомодации; возможны учащение судорог и снижение порога их возникновения (особенно при эпилепсии). Со стороны пищеварительной системы могут быть тошнота; иногда наблюдаются сухость во рту, запор, диарея; в отдельных случаях – нарушения функции печени. Имеет место также иногда артериальная гипотензия, ухудшение деятельности сердечно-сосудистой системы [5, 43].

Побочные эффекты возникают, главным образом, в начале лечения, при быстром повышении дозы, при назначении в дозе более 60 мг/сут, а также у пациентов пожилого возраста. При несоблюдении начальных доз, а также самостоятельном увеличении дозировки препарат может стать причиной возникновения лекарственной зависимости.

Резкое прерывание лечения баклофеном, а также несоблюдение начальных доз может привести к тяжёлому синдрому отмены, который напоминает отмену бензодиазепинов и алкогольную абстиненцию [33, 34, 109].

Немедицинское употребление баклофена связано с тем, что при приеме 50-150 мг проявляется достаточно сильный антидепрессивный эффект, улучшается настроение, увеличивается уверенность в себе, перерастающая в наглость, пропадают комплексы. Если дозировка баклофена была очень большой, может возникнуть агрессия, увеличивается эмоциональность, происходят резкие перепады настроения.

Основным проявлением передозировки является угнетение ЦНС. Усиливаются побочные эффекты, появляется спутанность сознания, нарушение походки, галлюцинации, судороги, тошнота, рвота, сухость во рту, отвращение к пище [43]; в отдельных случаях – кома [76, 99], угнетение дыхания [34]. В литературе описаны случаи острых отравлений при передозировке баклофена. При этом концентрация баклофена достигает в сыворотке крови 1,1-3,5 мг/ дм³ (токсическая концентрация) [46, 102, 104, 132]. Лечение заключается в промывании желудка, гемодилюции, форсированном диурезе, симптоматической терапии. Специфического антидота не существует [31, 43].

В результате передозировки баклофена может наступить смерть [19, 65, 74, 76]. В этом случае концентрация баклофена в сыворотке крови может достигать 17 мг/дм³, а в моче – 760 мг/ дм³ [62, 74, 102, 132].

При одновременном применении баклофена совместно с различными лекарственными и наркотическими средствами, воздействующих на ЦНС (например, алкоголь, диазепам, трициклические антидепрессанты), состояние пациента может ухудшаться [83, 122]. Более серьезные побочные действия могут возникнуть у пациентов, в истории болезни которых имеются

психиатрические заболевания или церебральные сосудистые заболевания (например, инсульт), а также у пациентов пожилого возраста [6].

С 80-х годов в литературе встречаются сообщения о случаях отравления баклофеном [65, 76, 90, 92, 101, 105, 114]

Люди с наркотической аддикцией часто применяют баклофен в немедицинских целях [8]. Благодаря баклофену, они входят в психоделическое состояние, которое так же называется «трипом». Трип – это сленговое слово, обозначающее странные переживания, вызванные употреблением психоактивных веществ. Использование препарата в данном аспекте очень опасно: наркоманы принимают таблетки баклофена в большом количестве, из-за чего проявляются тяжелейшие побочные эффекты. В сочетании с алкоголем и другими наркотическими средствами, большая доза таблеток может привести к смерти [43].

При постоянном употреблении большой дозы баклофена возникает психическая и физическая зависимость, а отмена препарата может спровоцировать тяжелую депрессию, вплоть до суицидальных намерений.

1.4 Методы обнаружения и количественного определения баклофена в биологических объектах

При подозрении на отравление баклофеном возникает необходимость определения его в биологических объектах.

Для качественного и количественного определения баклофена в биологических объектах в литературе описаны следующие аналитические методы:

- спектроскопические методы (УФ-, ИК-спектроскопия, флуориметрия) [68, 70-71, 82], данные методы применяют в основном для чистого вещества в фармакопейном анализе;

- хроматографические методы, широко применяемые в ХТА (хроматография в тонком слое сорбента [13, 19, 36, 88], газо-жидкостная хроматография [64, 85], газовая хромато-масс-спектрометрия [116] и

высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым [79, 81, 97, 106, 107, 119, 128, 131], флуоресцентным [69], масс-спектрометрическим [77, 95] электрохимическим [96] или электронозахватным детекторами [110]);

- электрохимические методы (ионселективные электроды) при анализе баклофена в таблетках [32, 113];

- капиллярный электрофорез с флуоресцентным детектором, УФ-детектором, tandemным масс-спектрометрическим детектором [54, 59-61, 66, 78, 86, 120].

Поскольку энантиомеры баклофена имеют различную фармакологическую активность, то особое внимание многие авторы уделяют разделению и определению энантиомеров баклофена [121, 125, 127, 133].

1.4.1 Спектроскопические методы

Спектрофотометрический метод в анализе лекарственных и наркотических средств – это один из самых простых и достаточно точных методов. Метод предполагает использование органических реагентов, дающих контрастные цветные реакции с различными веществами, что позволяет определять некоторые фармацевтические препараты по их реакции с органическими красителями. Известно достаточно большое количество методик определения лекарственных средств группы алкалоидов с применением различных органических и неорганических реагентов [4, 30].

Для количественного определения баклофена в таблетках по ГФ РФ используют метод УФ-спектроскопии, измеряя величину оптической плотности раствора баклофена при 266 и 290 нм, используя в качестве раствора сравнения 0,1М хлороводородную кислоту [33]. По Европейской фармакопее идентификацию баклофена в таблетках рекомендуют проводить методами УФ- и ИК- спектроскопии [67].

Флуороденситометрическое определение баклофена основано на реакции баклофена с 4-хлор-7-нитробензофуразаном и измерении интенсивности флуоресценции при 540 нм [68].

1.4.2 Хроматографические методы

Хроматографические методы анализа являются наиболее распространенными в анализе лекарственных и наркотических средств.

Тонкослойная хроматография – один из скрининговых методов качественного и количественного определения наркотических и лекарственных веществ. Доступность метода ТСХ, широкий круг решаемых с ее помощью аналитических задач и, главное, возможность одновременного анализа от 2 до 50 проб на одной хроматографической пластинке обеспечили методу ТСХ очень широкое распространение [14, 20, 36, 100]. Метод ТСХ используют для определения подлинности баклофена в таблетках; при этом применяют следующие системы растворителей: н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:1), уксусная кислота – изопропиловый спирт – вода (3:14:3), муравьиная кислота – вода – метанол – хлороформ – этилацетат (5:5:20:30:40). Учитывая, что баклофен относится к группе аминокислот, в качестве проявляющего реагента находит применение раствор нингидрина [31, 33, 58].

В настоящее время широкое распространение в химико-токсикологическом анализе получила газовая хроматография с масс-селективным детектированием (ГХ/МС) как высокоспецифичный, чувствительный и достаточно экспрессный метод. По сравнению с прочими хроматографическими методами надежность идентификации наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ существенно повышается по причине использования специфической характеристики вещества—масс-спектра, в дополнение к параметрам удерживания, получаемым в хроматографическом процессе [16, 20, 27, 41].

При газохроматографическом методе определения происходит детектирование не самого баклофена, а его производного, 4-(*пара*-хлорфенил)-пирролидин-2-она, образующегося при нагревании баклофена выше 117-118 °С [31, 56].

Предел детектирования баклофена в плазме крови и моче составляет 50 мг/л [64]. При сочетании газо-хроматографического разделения с масс-

спектрометрическим детектором предел детектирования баклофена в сыворотке крови увеличивается в 10 раз [116].

Для наиболее успешного решения задачи по определению баклофена применяют дериватизацию. С этой целью определяемое вещество переводят в его производное, обладающее иными (лучшими с точки зрения используемого аналитического метода) аналитическими свойствами. В газовой хроматографии применение дериватизации связано с получением более летучих соединений, снижением полярности функциональных групп, и, как следствие, улучшение хроматографических свойств вещества, либо получение продуктов, специфичных для определенного типа детекторов (ЭЗД, ПИД и т.п.). Применение дериватизации позволяет развивать химический анализ, делать его более экспрессным, чувствительным и надежным [9-11, 15, 27].

При газохроматографическом методе анализа для дериватизации применяют уксусный, трифторуксусный, пропионовый и пентафторпропионовый ангидриды, пентафторпропанол, триметилсилильные производные и др. Применение ацетилирования является наиболее доступной и широко распространенной процедурой в анализе лекарственных и наркотических веществ. Фторорганические реагенты являются дорогостоящими, что ограничивает их использование в ежедневном анализе. Метильные и триметилсилильные производные соединений также имеют специфичные масс-спектры, но процедура анализа силилированной пробы сопровождается загрязнением масс-селективного детектора и приводит к изменению свойств хроматографических колонок [27, 94].

В литературе описано определение баклофена методом обращено-фазовой ВЭЖХ на неполярных колонках с ультрафиолетовым, флуоресцентным, масс-спектрометрическим или электрохимическим детектором.

Значительное число работ [1, 37, 40-41, 43, 50-51] показывает, что огромное влияние на общие характеристики хроматографического разделения оказывает выбор состава подвижной фазы (ПФ). Последняя состоит из основных и второстепенных компонентов. Второстепенные компоненты (<5%)

обычно носят название модификаторов ПФ. Типичными модификаторами ПФ являются неразбавленные кислоты (фосфорная, трифторуксусная и уксусная) и основания (триэтиламин, триэтаноламин и диэтиламин), а также буферные системы (фосфат, ацетат или смешанные, такие как трифторуксусная кислота/триэтиламин) и ион-парные реагенты.

Одним из важнейших параметров оптимизации селективности в обращено-фазовой ВЭЖХ является рН подвижной фазы. В зависимости от рН элюента изменяется время удерживания слабых кислот.

Действие модификаторов может быть связано с различными физико-химическими процессами. Модификатор может использоваться для подавления ионизации сорбата, что в обращено-фазовой хроматографии приводит к улучшению формы пика. Введение специфического модификатора направляет сорбцию по наиболее выгодному в данном случае механизму. Модификаторы водных и водно-органических подвижных фаз придают элюенту желаемую ионную силу и рН [40]. В качестве ПФ для определения баклофена методом ВЭЖХ используют: метанол – вода (45:55) [69], ацетонитрил – 0,25% раствор уксусной кислоты [95], метанол – фосфатный буфер (36:74) [96], ацетонитрил – 0,05 М KH_2PO_4 (25:75) [84] и др.

Баклофен может быть определен методом ион-парной хроматографии [67, 79]. Суть метода ион-парной хроматографии заключается в динамическом модифицировании обращено-фазового сорбента (октил-, октадецилсиликагеля) группами, обладающими ионообменными свойствами. Для этих целей в типичные ПФ для обращено-фазовой хроматографии добавляют гидрофобные органические соединения с ионогенными группами. Для разделения оснований используют алкилсульфаты натрия (алкил от C_4 до C_{12}) в количестве 0,001-0,01 моль/л, создавая буферным раствором рН 2-5. Для разделения кислот применяют соли тетраалкиламмония (фосфат тетрабутиламмония, бромид цетилтриметиламмония и др.) в концентрациях 0,001-0,01 моль/л и рН 3-7 [37, 40].

В ион-парном режиме селективность разделения неионогенных компонентов анализируемой пробы лимитируется обращено-фазовым

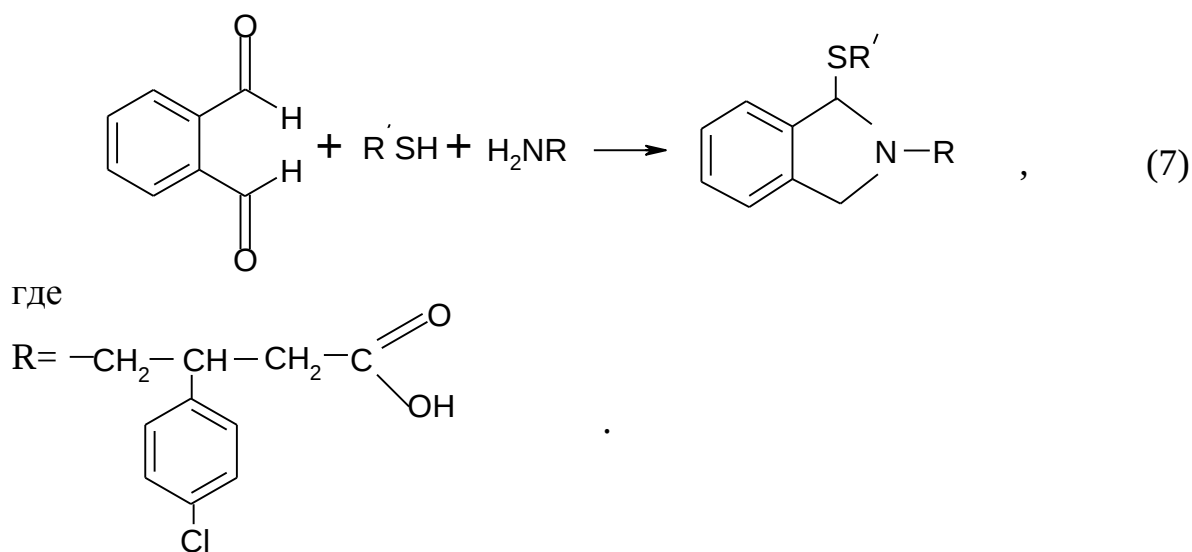
механизмом удерживания, а удерживание оснований и кислот заметно возрастает, улучшается форма их хроматографических пиков [3, 44]. Для определения баклофена в качестве ион-парных агентов используют гептансульфонат натрия и октансульфонат натрия [67, 106].

Для жидкостной хроматографии с применением спектрофотометрических и флуориметрических детекторов дериватизация позволяет получать соединения, чувствительные к данному типу детекторов. Так для определения баклофена методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектором используют дериватизацию с беноксапрофен хлоридом [88, 93].

В настоящее время разрабатывается множество энантиоселективных методик. Одним из методов определения энантиомеров баклофена является метод нормально-фазовой ВЭЖХ с флуоресцентным детектором. При этом в качестве хиральных дериватизирующих реагентов используют беноксапрофен хлорид, напроксен хлорид, ацилхлориды, *o*-фталевый диальдегид и др [117, 124, 127-128].

При дериватизации с напроксен хлоридом и беноксапрофен хлоридом предварительно проводят реакцию баклофена с бутанолом, с образованием сложного эфира [49].

Реакцию получения *o*-фталевых производных баклофена выполняют в присутствии серосодержащего нуклеофила (7).



о-Фталевые производные обладают интенсивной флуоресценцией и светопоглощением, поэтому возможно определение этих производных методом ВЭЖХ с амперометрическим детектором [49].

1.5 Скрининг на наркотические и лекарственные вещества в судебно-химическом исследовании и химико-токсикологическом анализе

Процесс химико-токсикологического и судебно-химического анализов можно разделить на три части:

- I часть включает в себя предварительные методы анализа, позволяющие сделать заключение о наличии или отсутствии тех или иных групп наркотических и лекарственных веществ, – это прежде всего иммунные методы (тест-полоски, флуоресцентно-поляризационный иммуноанализ);

- II часть анализа – это предварительная пробоподготовка объектов исследования, изолирование анализируемых веществ, дериватизация в ряде случаев;

- III часть – подтверждающий анализ проб, дающих положительные реакции при скрининге, вторым независимым методом с количественным определением идентифицируемого вещества.

В судебно-химическом анализе в качестве объектов исследования используют: кровь, мочу, печень, почки, содержимое и стенку желудка [20]; в химико-токсикологическом анализе – в основном только кровь, мочу.

В качестве объекта для предварительных методов исследования используется моча, так как концентрация лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов в моче значительно превышает их концентрации в крови или плазме. В большинстве случаев образцы крови или плазмы анализируются для количественного определения токсиканта, обнаруженного при скрининге мочи. Кроме того, концентрация вещества в крови используется для токсикологической оценки его воздействия на организм [9, 27-28].

Из различных методов предварительного исследования иммунные методы имеют ряд преимуществ, к которым относятся, прежде всего, простота

проведения анализа, отсутствие предварительных манипуляций с объектом исследования и высокая чувствительность. Многие химико-токсикологические и судебно-химические лаборатории в России в качестве предварительного метода исследования используют тонкослойную хроматографию, лишенную вышеперечисленных преимуществ, однако являющуюся недорогим и экспрессным методом предварительного анализа [14, 16].

Подготовка образцов мочи перед анализом должна обеспечить:

- разрушение конъюгатов, так как большинство полярных метаболитов наркотических и лекарственных веществ выводятся с мочой в конъюгированном виде, т.е. в виде соединений с глюкуроновой кислотой;
- изолирование анализируемых веществ из биоматериала;
- дериватизацию полярных труднолетучих наркотических, лекарственных веществ и их метаболитов [9, 20, 94].

В то же время важно, чтобы при подготовке образцов в анализируемых соединениях не нарушалась их структура, так как это приведет к трудностям их идентификации. Для разрушения конъюгатов применяется либо мягкий, но продолжительный энзимный гидролиз, либо более жесткий прямой кислотный гидролиз. Для токсикологических анализов (особенно срочных) применяют кислотный гидролиз. При этом обязательно необходимо учитывать возможность гидролиза соединений, имеющих сложноэфирные и амидные связи, а также иногда и простые эфирные связи. Для скрининга наркотических и лекарственных веществ используют кислотный гидролиз в растворе 7% хлороводородной кислоты [28, 42].

Для выделения многих лекарственных и наркотических веществ из биологических объектов при проведении общего (ненаправленного) анализа в токсикологической химии используют различные приемы изолирования: изолирование подкисленным этанолом (метод Стаса – Отто); изолирование водой, подкисленной щавелевой кислотой (метод А.А. Васильевой); изолирование нейтральным ацетоном (метод В.А. Карташова); кроме того применяют также частные методы изолирования веществ кислотного характера

– метод Е. Грусц-Харди – изолирование смесью этанола и хлороформа, изолирование барбитуратов подщелоченной водой (метод П. Валова), метод изолирования алкалоидов водой, подкисленной серной кислотой (по В.Ф. Крамаренко). Указанные методики извлечения токсикологически важных веществ основаны на применении жидкость-жидкостной экстракции органическими растворителями [26]. Учитывая очень малую растворимость баклофена во многих органических растворителях, перечисленные методики пробоподготовки могут быть неприменимы для извлечения баклофена из биологических объектов. Перспективным направлением является использование твердофазной экстракции с целью получения более чистых образцов для дальнейшего анализа [73].

В судебной и клинической токсикологии для рутинного скрининга (нецелевого поиска) наркотических, лекарственных веществ, их метаболитов, а также пестицидов и фосфорорганических соединений в биологических объектах широко используют газовую хроматографию на капиллярных колонках [17-18, 20, 94].

Особую популярность в настоящее время приобрел систематический токсикологический анализ, проводимый методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором. Высокая разрешающая способность газовой хроматографии на капиллярных колонках в сочетании с большой информативностью масс-спектрометрии позволяет с высокой степенью надежности детектировать одновременно большое количество токсикологически важных веществ в биообразцах [28, 57].

Скрининг методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором может быть проведен с использованием реконструированных масс-хроматограмм по характеристическим ионам или поиск по групповым ионам. Позитивные сигналы поиска по характеристическим или групповым ионам могут быть подтверждены сравнением полных масс спектров со справочными данными.

Если при скрининге обнаруживаются какие-либо лекарственные или наркотические вещества, имеющие токсикологическое значение, далее

проводится анализ биообъектов по частным методикам для подтверждения и количественного определения этих веществ.

ВЭЖХ в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе используется для анализа нелетучих соединений и как подтверждающий метод с УФ- и МС-детектированием.

Анализ литературных данных показал, что комплексного исследования баклофена в химико-токсикологическом и судебно-химическом аспектах не проводилось. Требования, предъявляемые на современном этапе к СХИ и ХТА, предполагают наличие утвержденных методических рекомендаций по методам изолирования и анализа токсикологически важных веществ в биологических объектах.

Существующие методики анализа баклофена в биологических объектах предусматривают использование дорогостоящих и труднодоступных реагентов и детекторов и не предназначены для рутинного анализа. Согласно литературным данным, самыми перспективными методами для анализа баклофена являются газовая хроматография с масс-селективным детектором и высокоэффективная жидкостная хроматография с использованием различных детекторов. Учитывая наличие случаев острых отравлений баклофеном, в том числе и с летальным исходом, актуальным является систематическое исследование по разработке и оптимизации методик судебно-химического и химико-токсикологического анализа баклофена.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И АППАРАТУРА

2.1 Объекты исследования

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

Для изучения методов обнаружения и изолирования баклофена из биологических объектов использовали образцы крови, мочи и тканей печени, предварительно проверенные на отсутствие наркотических и лекарственных веществ, предоставленные Красноярским государственным бюджетным учреждением здравоохранения «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы» (ККБСМЭ).

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.

Поскольку состояние пациентов не позволяло выразить свое согласие и в большинстве случаев угрожало их жизни, решение о проведении лечения и взятии биологических жидкостей (крови, мочи) для проведения диагностики принималось консилиумом врачей-токсикологов в соответствии с п.п. 9.1, 10.1 ст. 20 Федерального закона «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 № 323-ФЗ.

2.2 Методы исследования, аппаратура и условия

Для определения баклофена в работе использовали следующие методы анализа:

- Исследование баклофена методом ГХ/МС проводили в судебно-химическом отделении ККБСМЭ с помощью газового хроматографа Agilent Technologies 6890N (США) с автосамплером Agilent Technologies 7683B и квадрупольным масс-спектрометром Agilent Technologies 5973 Network в качестве детектора. Использовали кварцевую капиллярную колонку HP-5MS (сополимер 5%-дифенил-95%-диметилсилоксана) 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). Время задержки растворителя 3.5 мин.

ГХ/МС анализ исследуемых растворов проводили в режиме сканирования (SCAN) в диапазоне масс от 40 до 600 а.е.м., и в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) по характеристическим ионам производных баклофена. В качестве характеристических выбирали базовый ион масс-спектра и молекулярный ион анализируемого соединения. При отсутствии в масс-спектре интенсивного молекулярного иона в качестве дополнительного к базовому выбирали фрагментарный ион наибольшей интенсивности. Идентификацию масс-спектров проводили с использованием библиотечных данных MPWTOX7 и Wiley7.

Для уменьшения полярности функциональных групп в молекуле баклофена проводили его дериватизацию уксусным ангидридом в присутствии пиридина по следующей методике. В вials помещали 10, 20, 100 мкл

исходного раствора баклофена в этаноле с концентрацией 1 г/дм³ (п. 6), выпаривали досуха в токе теплого воздуха, прибавляли по 200 мкл смеси уксусный ангидрид – пиридин (3:2), выдерживали в термостате в течение 30 мин при 70 °С. После окончания реакции ацетилирования жидкость выпаривали в токе теплого воздуха, сухой остаток растворяли в 1 мл этилацетата и исследовали методом ГХ/МС.

Получение метилового эфира баклофена проводили следующим образом: к сухому остатку прибавляли 500 мкл безводного ацетона, 40 мкл йодистого метила и 20-25 мг безводного карбоната калия, герметично закрывали и выдерживали в термостате 60 мин при 60 °С. Флакон охлаждали, отбирали жидкую фракцию реакционной смеси, переносили в чистую виалу и испаряли в токе теплого воздуха. Сухой остаток растворяли в 100 мкл этилацетата.

- Исследования методом ВЭЖХ-УФ проводили в лаборатории хроматографических методов анализа Центра коллективного пользования Сибирского федерального университета (ЦКП СФУ) с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent Technologies 1200 (США) с многоволновым диодно-матричным детектором. Условия анализа: колонка Phenomenex Luna 5u C18(2) 100 Å, 250×4.6 мм, 5 мкм; предколонка Eclipse XDB-C18 4-Pack 4.6x12.5 мм, 5 мкм. Температура термостата колонки 30 °С. Подвижная фаза (ПФ): ацетонитрил – 10мМ триэтиламина, градиентное элюирование, состав подвижной фазы изменялся от 0 до 20% ацетонитрила (таблица 1).

Таблица 1 – Концентрация ацетонитрила в элюенте

Время, мин	Концентрация ацетонитрила в ПФ, %
0,1	10
3,0	20
10,0	10

При варьировании состава ПФ в качестве модификаторов водного компонента ПФ использовали: раствор *o*-фосфорной кислоты с рН от 1.8 до 5.5; раствор гидрофосфата калия с *o*-фосфорной кислотой с рН от 1.8 до 5.5; фосфатный буферный раствор с рН 8.0; раствор триэтиламина с рН 9.5 и 7.5.

Используемый ацетонитрил имел квалификацию «осч» для градиентной ВЭЖХ фирмы Рамсгеас (Испания), вода дистиллированная, отфильтрованная в системе очистки воды Agilent Technologies, реагенты для модификации водного компонента ПФ имели квалификацию ХЧ. Соотношение компонентов подвижной фазы брали в объемных частях. Объем вводимой пробы 20 мкл, ввод пробы осуществляли с помощью автосамплера. Регистрация поглощения проводилась при длинах волн максимального поглощения баклофена (220, 259, 266 и 274 нм), количественное определение проводили при длине волны 220 нм. Обработку полученных данных выполняли с использованием программного обеспечения Agilent ChemStation.

В используемой хроматографической системе аналитическая колонка соединена с предколонкой через шестиходовой кран (рис. 4). Когда кран находится в позиции «смыв на предколонку», проба, отобранная автосамплером, попадает на предколонку. Низкомолекулярные вещества не удерживаются на сорбенте предколонки, и элюируются в слив, а целевые компоненты концентрируются в порах частиц сорбента. Когда кран переключается в позицию «смыв на аналитическую колонку», эти компоненты попадают соответственно на аналитическую колонку.

Такой подход позволяет определить время, необходимое для попадания на колонку определяемого вещества, и отсеять остальные компоненты, которые не представляют интереса для анализа.

Скорость потока элюента для нанесения пробы на предколонку 1 мл/мин. Скорость потока элюента для аналитической колонки 0.8 мл/мин. Подбор времени переключения крана определялся экспериментально и составил 10 с.

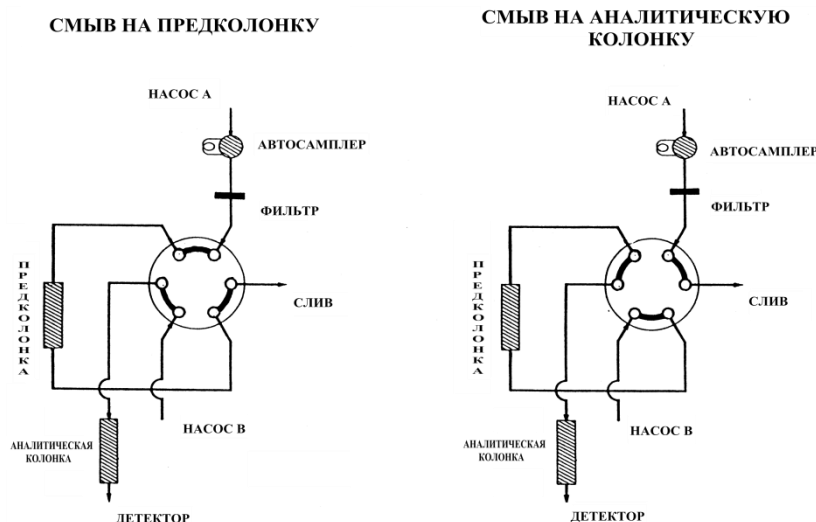


Рисунок 4 – Схема используемой хроматографической системы

- Исследования методом ВЭЖХ-МС/МС проводили в Центральной научно-исследовательской лаборатории Красноярского государственного медицинского университета (ЦНИЛ КрасГМУ) 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 колонки 37 °С, ПФ ацетонитрил – метанол – 0.65 мМ водный раствор ацетата аммония (15:15:70), изократический режим, скорость потока элюента 1 мл/мин. Объем вводимой пробы 20 мкл, ввод пробы осуществляли с помощью автосамплера. После каждого анализа колонка промывалась чистым ацетонитрилом в течение 5 мин. Масс-спектрометр работал в режиме регистрации положительных ионов, ионизация электроспреем. Условия работы источника ионов: температура источника ионов 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), с помощью которой были подобраны параметры MRM переходов.

Вспомогательное оборудование и методики:

- *Методика получения субстанции баклофена.* 10 таблеток баклофена с содержанием субстанции по 25 мг тщательно растирали в порошок в фарфоровой ступке, прибавляли 20 мл 0.1М хлороводородной кислоты, взвесь количественно переносили в стеклянный флакон объемом 25 мл, встряхивали на шейкере в течение 15 мин и центрифугировали 15 мин при скорости 3000 об/мин (центрифуга Eppendorf, Германия). Надосадочную жидкость отделяли и добавляли по каплям 50%-ный раствор гидроксида калия при перемешивании до pH 7. Выпавший осадок отделяли центрифугированием в течение 15 мин, осадок промывали ледяной дистиллированной водой и высушивали в термостате при 60 °C в течение 24 ч. Чистоту и подлинность субстанции проверяли методами ИК, УФ-спектроскопии, и по температуре плавления.

- Взвешивание субстанции проводили на электронных аналитических весах XP603S Mettler Toledo (Швейцария).

- Температуру плавления определяли в термосистеме Mettler Toledo (Швейцария).

- ИК-спектры получали на ИК-Фурье спектрометре Bruker Alpha (Германия).

- УФ-спектры снимали на спектрофотометре Thermo Helios γ (Thermo Electron Corporation, США) в кварцевых кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

- Для получения УФ-спектров, а также для изучения хроматографических характеристик баклофена готовили модельные растворы с использованием дозаторов переменного объема Ленпипет (Россия), Eppendorf (Германия). Для приготовления исходного раствора баклофена с концентрацией 1 г/дм³ точную навеску субстанции баклофена (10 мг) растворяли в 10 мл 0.1М растворе хлороводородной кислоты. В случае ГХ/МС анализа использовали раствор баклофена в 95% этаноле. Для анализа методом ВЭЖХ-МС/МС готовили раствор баклофена (концентрация 0.001 г/дм³) в 0.1%-ном растворе муравьиной кислоты в метаноле.

- Хроматографирование в тонком слое выполняли в восходящем токе заданной системы растворителей при комнатной температуре в герметически

закрытых стеклянных камерах, предварительно насыщенных заданной системой, используя хроматографические пластины «Sorbfil ПТСХ-АФ-А» (Россия). Нанесение исследованных образцов на хроматографические пластины осуществляли при помощи капилляров и калибровочных микропипеток. Растворители для хроматографии и реактивы для получения детекторов использовали марки ХЧ или ЧДА.

Для ТСХ применяли следующие системы растворителей:

- хлороформ – ацетон (9:1);
- хлороформ – ацетон – 25 % раствор аммиака (24:12:1);
- н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:1);
- метанол – 25 % раствор аммиака (100:1,5).

Для обнаружения баклофена использовали: 0.5%-ный раствор нингидрина в смеси н-бутанол – 10% ледяная уксусная кислота (95:5); раствор иодида висмута в растворе иодида калия (реактив Драгендорфа) и 0.5М раствор серной кислоты; 5% раствор сульфата ртути в 5% растворе серной кислоты, 0.02% раствор дифенилкарбазона в хлороформе

Время хроматографирования в зависимости от выбранной системы составляло 20-35 мин. Соотношение растворителей брали в объемных частях. Все величины R_f обнаруженных соединений являются средними из 5-ти измерений.

- Для разработанных методик определяли следующие метрологические характеристики: специфичность, линейность, правильность, повторяемость, предел количественного определения [7, 38, 39, 48,75].

Специфичность методик подтверждали, исследуя образцы биологических объектов, содержащих баклофен, и в его отсутствии. Для подтверждения отсутствия влияния органической матрицы исследовали не менее 5 образцов биологических жидкостей для каждой разработанной методики. Специфичность подтверждали отсутствием эндогенных соединений в месте элюирования баклофена.

Линейность методики отражает пропорциональность увеличения (уменьшения) площади пика на хроматограмме при возрастании (снижении)

количества анализируемого вещества. Для подтверждения линейности рассчитывали коэффициент корреляции, который является критерием линейной зависимости между концентрацией определяемого вещества и площадью его хроматографического пика, а также приводили уравнение линейной регрессии для каждого градуировочного графика.

Правильность методики характеризует близость результатов испытаний, полученных в данных условиях, к истинному значению. *Повторяемость методики* характеризует надежность анализа по степени совпадения результатов индивидуальных определений при многократном введении одного и того же образца. Правильность и повторяемость методики устанавливали методом «введено-найдено» по всем концентрационным уровням градуировочного графика в трех параллельных измерениях. Параметр *прецизионность аналитической методики* включает в себя повторяемость, промежуточную прецизионность и воспроизводимость. В данной работе оценивали повторяемость методики.

Предел количественного определения – наименьшее содержание аналита, которое может быть количественно определено с помощью данной методики анализа вещества с установленным значением характеристик погрешности. Предел количественного определения рассчитывали как наименьшую концентрацию баклофена, при которой отношение сигнал – шум составляло 10:1.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ БАКЛОФЕНА СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИМИ, ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ И ТАНДЕМНЫМИ 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. Методики приготовления модельных растворов баклофена для исследования различными хроматографическими методами описаны в главе 2.

3.1 Изучение спектральных характеристик субстанции баклофена

Для подтверждения подлинности и чистоты субстанции баклофена, выделенной из таблетки препарата «Баклофен», определяли ее температуру плавления, получали УФ- и ИК-спектры. Т. пл. полученной субстанции составила 206 ± 1 °С, что совпадает с литературными данными [31, 58, 62, 67].

В ИК-спектре баклофена в области от 500 до 4000 см^{-1} в дисках с калия бромидом (2 мг/400 мг KBr) обнаружены следующие полосы поглощения, ν тах, см^{-1} : 830 (1,4-замещенные ароматические соединения); 1095 (валентное колебание связи C-Cl); 1374; 1398; 1497 (NH_2 -группа аминокислоты); 1534, 1575, 1616 (ароматическое кольцо) (рис. 5), что совпадает с литературными данными [46].

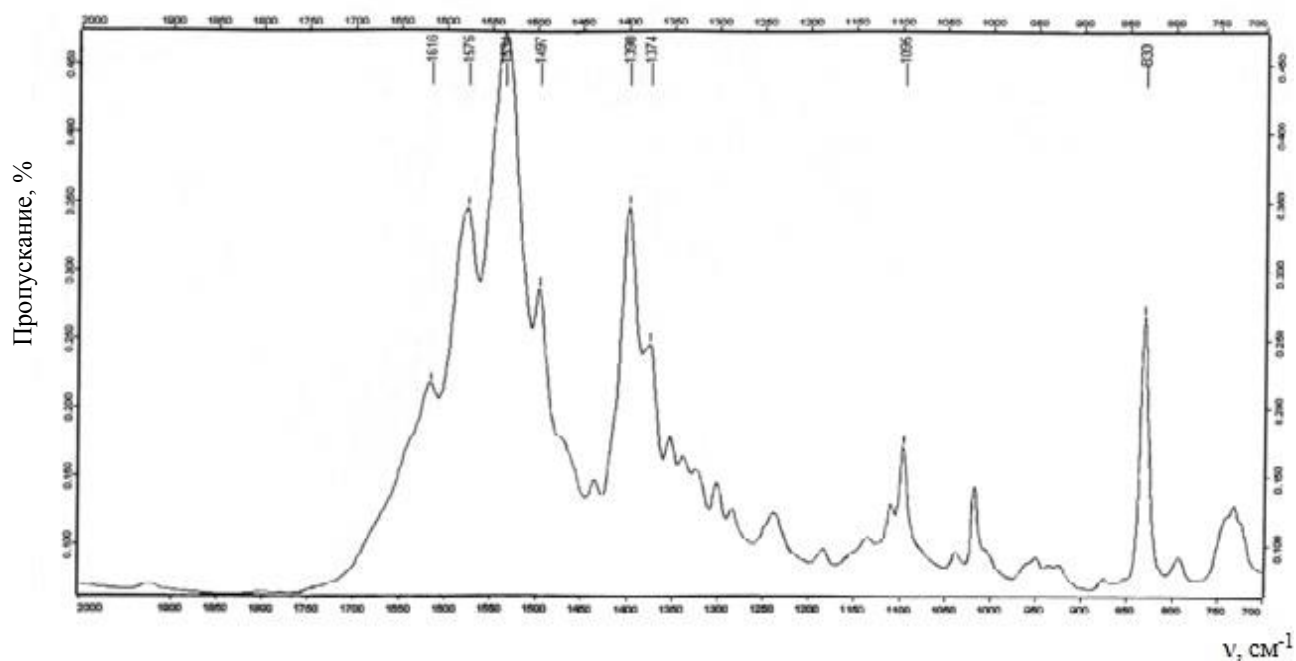


Рисунок 5 – ИК-спектр баклофена

В УФ-спектре раствора баклофена в 0.1М хлороводородной кислоте в диапазоне 210-350 нм имеются 4 максимума поглощения, нм: 220 (ароматическое кольцо), 259, 266, 274 (рис. 6-7).

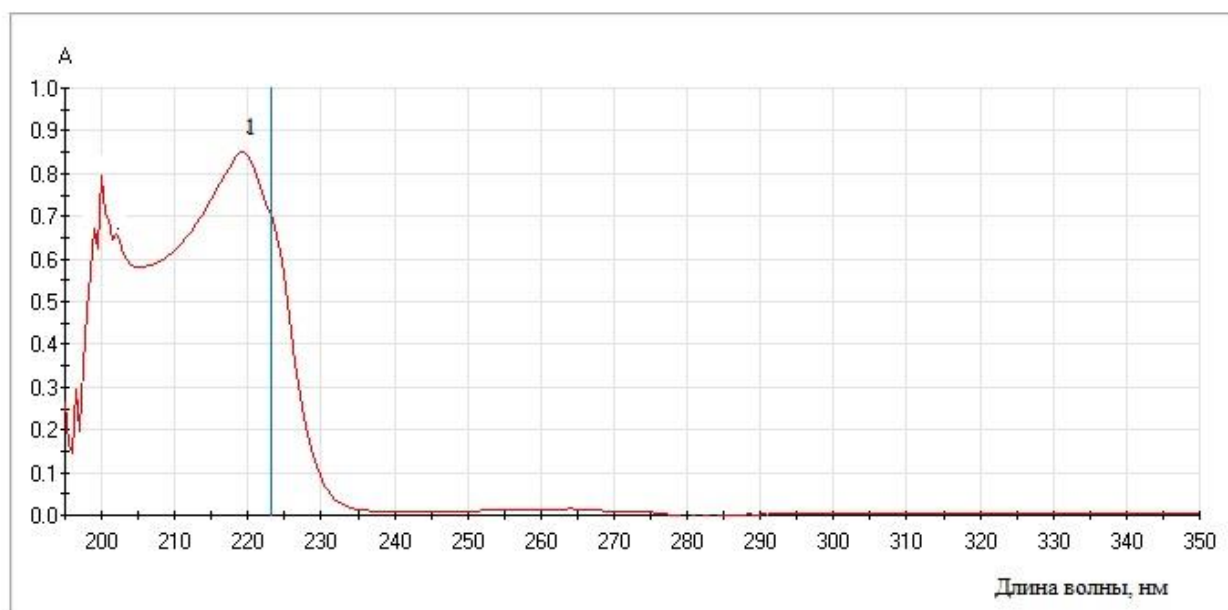


Рисунок 6 – УФ-спектр баклофена, концентрация 0.025 г/дм³ (1 – 220 нм)

Максимумы при длинах волн 259, 266 и 274 нм имеют небольшие коэффициенты экстинкции, поэтому при концентрациях баклофена менее 0.5 г/дм³ не видны на спектре.

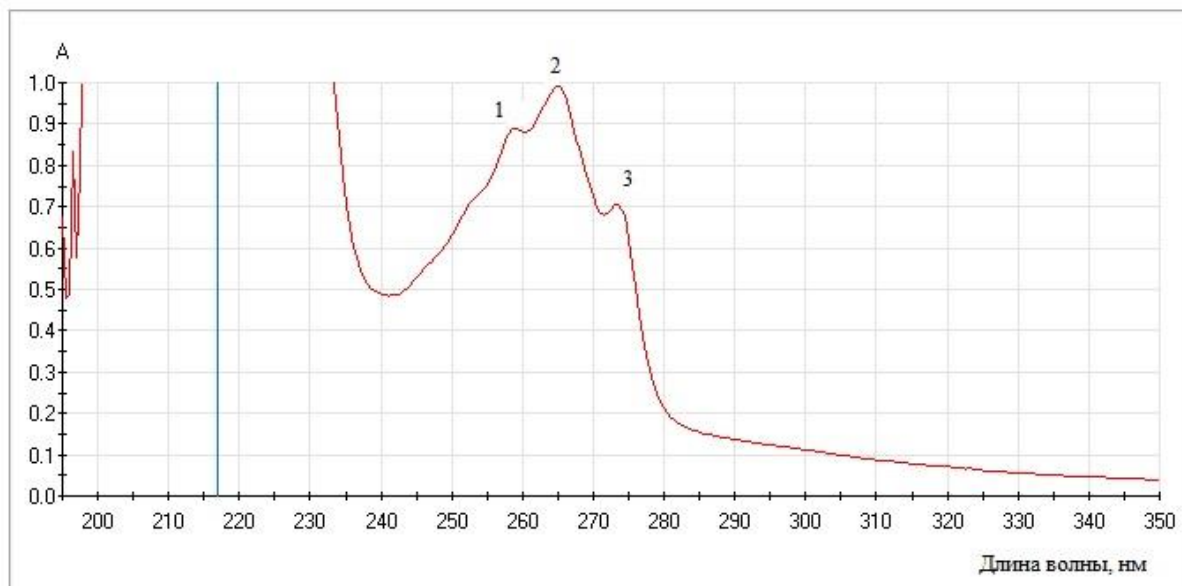


Рисунок 7 – УФ-спектр баклофена, концентрация 1 г/дм³ (1 – 259 нм, 2 – 266 нм, 3 – 274 нм)

Аналитическое значение имеет максимум при 220 ± 2 нм. Так как максимумы при длинах волн 259, 266 и 274 нм имеют небольшие коэффициенты экстинкции (около 0.02 для концентрации баклофена 0.025 г/дм³), то они не могут быть использованы для количественного определения и имеют значение только для идентификации баклофена.

3.2 Изучение хроматографических характеристик баклофена различными методами

3.2.1 Выбор условий определения баклофена методом ТСХ

Согласно приказу Минздравсоцразвития России № 40 от 27.01.2006 г. «Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя,

наркотических средств, психотропных и других токсических веществ», тонкослойная хроматография относится к предварительным химико-токсикологическим методам анализа. Метод заключается в разделении исследуемых веществ на пластинах для ТСХ в системе растворителей и проявлении чувствительными реактивами.

Исследовано хроматографическое поведение баклофена на пластинах Sorbfil в различных системах растворителей с использованием ряда проявителей. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Значения R_f баклофена в различных системах растворителей и результаты окрашивания баклофена различными проявляющими реактивами на хроматограммах

Система растворителей	Значение R_f баклофена	Реактив обнаружения	Окраска баклофена на хроматограмме
Хлороформ – ацетон (9:1)	0.03-0.05	0,5% раствор нингидрина в 10% уксусной кислоте	Розово-красная
Хлороформ – ацетон – 25 % раствор аммиака (24:12:1)	0.05-0.07	Раствор иодида висмута в растворе иодида калия (реактив Драгендорфа) и 0,5н раствор серной кислоты	Белые пятна на желтом фоне
н-Бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:1)	0.68-0.70	5% раствор сульфата ртути в 5% растворе серной кислоты и 0,02% раствор дифенилкарбазона в	Отсутствие окраски
Метанол – 25 % раствор аммиака (100:1,5)	0.75-0.77	хлороформе	

Как видно из табл. 2, наиболее 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).

3.2.2 Исследование баклофена методом ГХ/МС

При газо-хроматографическом определении баклофена происходит его дегидратация в инжекторе хроматографа с образованием 4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона [31, 64]. 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. 8).

При исследовании этанольного раствора баклофена без дериватизации минимально определяемая концентрация субстанции составила 100 мг/дм³. Время удерживания 4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона составило 7.36 мин (рис. 9).

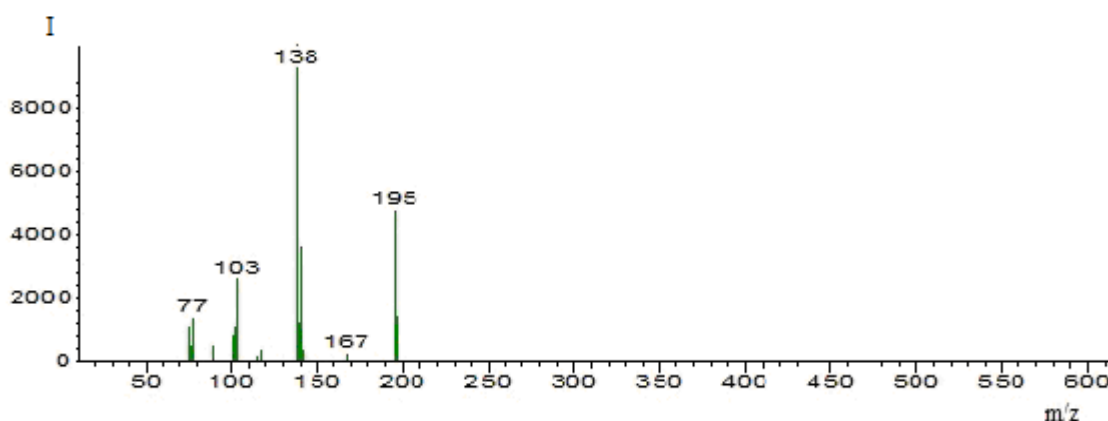


Рисунок 8 – Масс-спектр 4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона

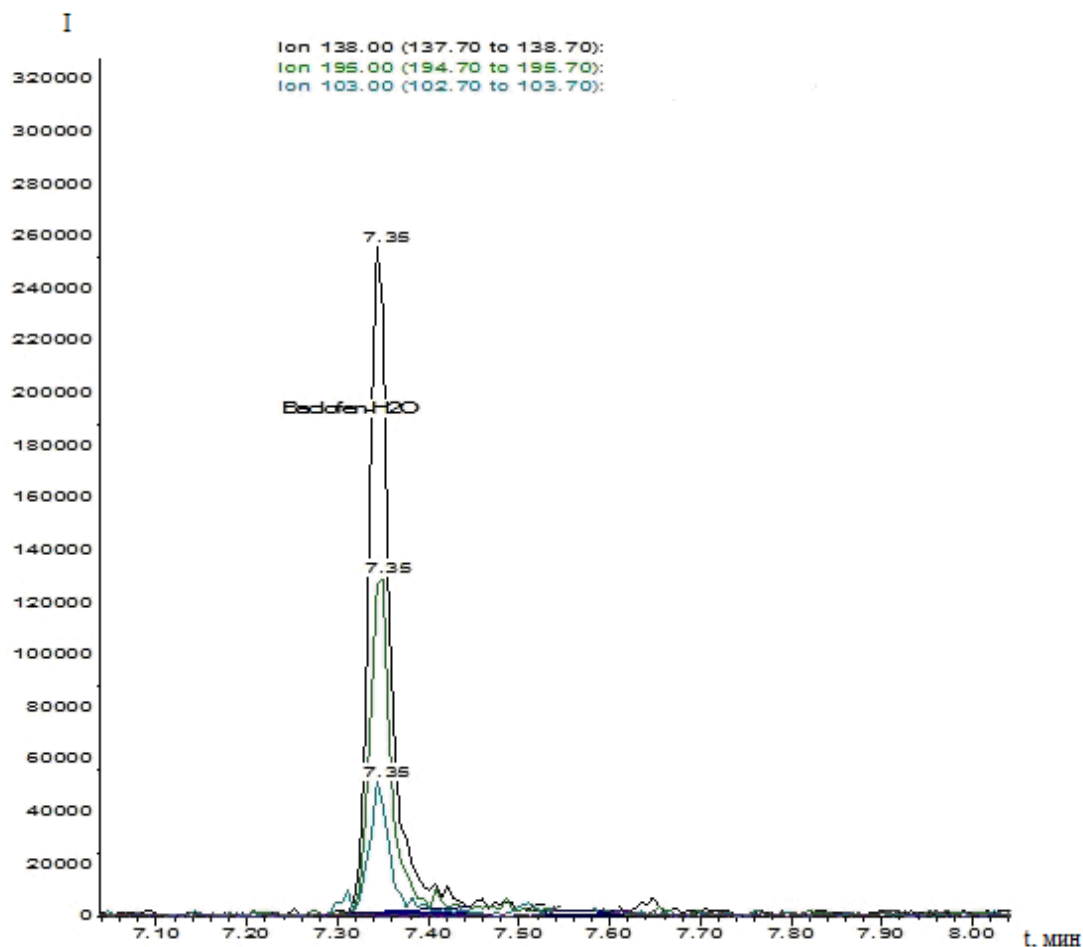


Рисунок 9 – Хроматограмма 4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона, С 300 мг/дм³

Для уменьшения полярности функциональных групп в молекуле баклофена проводили дериватизацию с двумя различными реагентами. В качестве дериватизирующих реагентов использовали уксусный ангидрид для получения ацетильных производных и йодметан для получения метильных производных.

В результате дериватизации с уксусным ангидридом получилось соединение N-ацетил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинон. При газо-хроматографическом определении баклофена в виде N-ацетил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона минимально определяемая концентрация составила 5 мг/дм³, а время удерживания – 8.39 мин. В масс-спектре N-ацетил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона отмечено три наиболее интенсивных иона с m/z 138, 195, 103,

237 (рис. 11). Хроматограмма исследуемого раствора баклофена с концентрацией 50 мг/дм³ после дериватизации приведена на рис. 10.

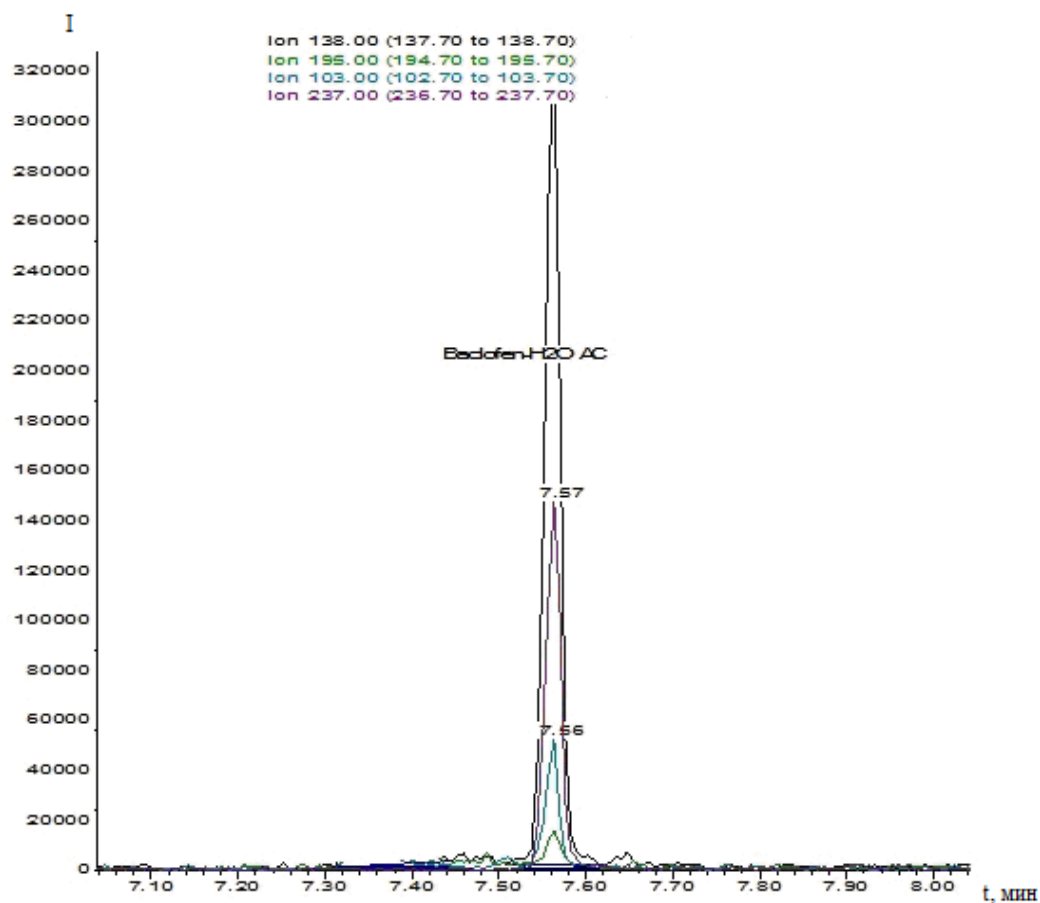


Рисунок 10 – Хроматограмма N-ацетил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона по характеристическим ионам m/z 138, 195, 237, 103, С 50 мг/дм³

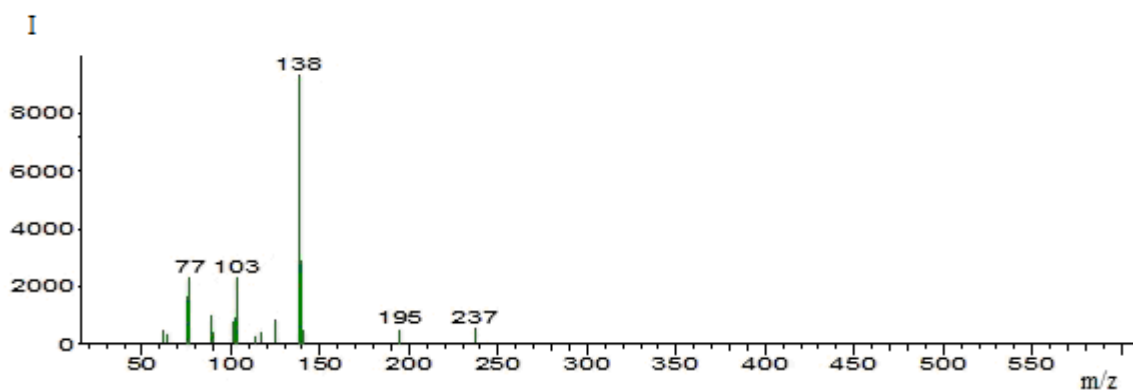


Рисунок 11 – Масс-спектр N-ацетил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона

При метилировании баклофена получилось соединение N-метил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинон, масс-спектр которого приведен на рис. 12. Время удерживания N-метил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона составило 6.22 мин (рис. 13), его минимально определяемая концентрация – 5 мг/дм³.

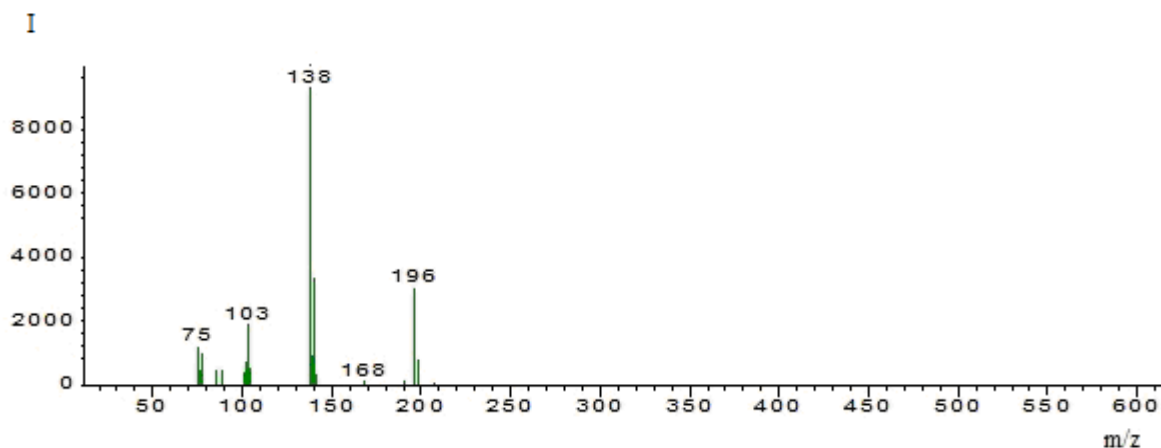


Рисунок 12 – Масс-спектр N-метил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона

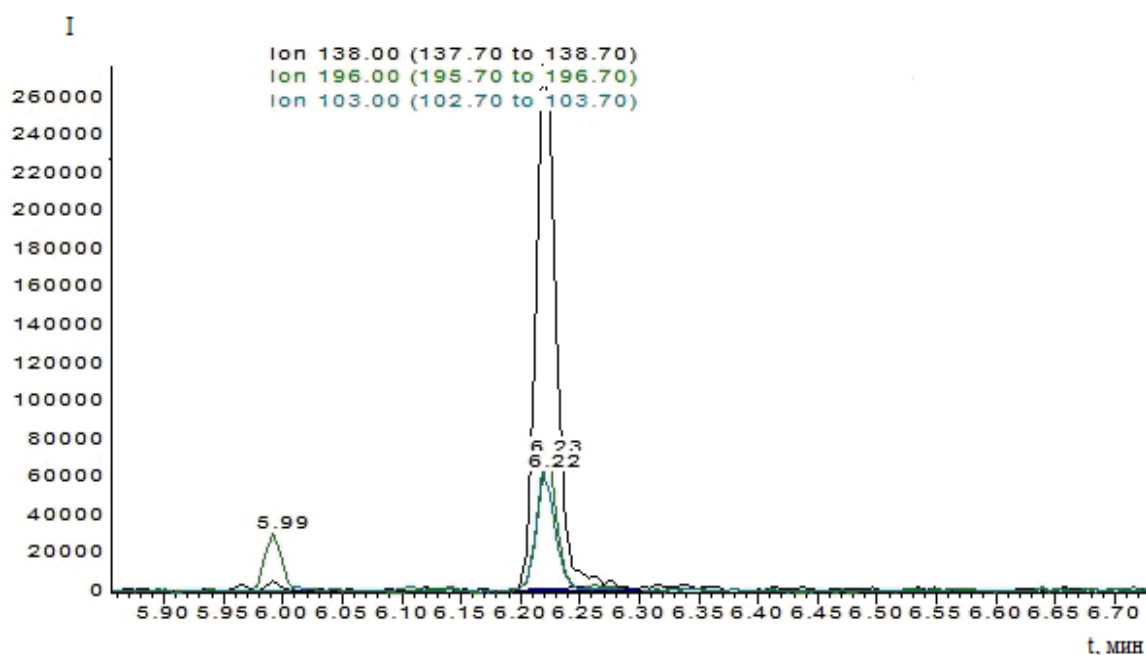
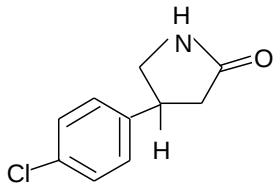
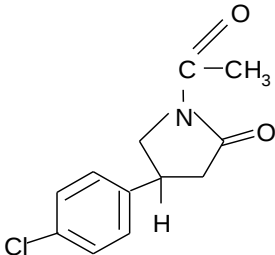
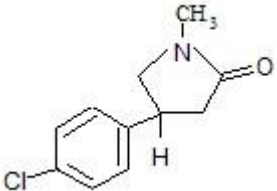


Рисунок 13 – Хроматограмма N-метил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона по характеристическим ионам m/z 138, 196, 103, С 50 мг/дм³

Масс-спектрометрические характеристики производных баклофена приведены в таблице 3.

Таблица 3 –Масс-спектрометрические характеристики производных баклофена

Вещество	Структурная формула	Эмпирическая формула	Молекулярная масса	Характеристические ионы, m/z	Фрагменты молекулы
4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинон		$C_{10}H_{10}NOCl$	195	195 138 103 77 51	$C_{10}H_{10}NOCl$ C_8H_7Cl C_8H_7 C_6H_5 C_4H_3
N-ацетил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинон		$C_{12}H_{12}NO_2Cl$	237	237 195 138 103 77 62	$C_{12}H_{12}NO_2Cl$ $C_{10}H_{10}NOCl$ C_8H_7Cl C_8H_7 C_6H_5 C_5H_2
N-метил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинон		$C_{11}H_{12}NOCl$	208	138 196 77	C_8H_7Cl $C_{10}H_{11}NOCl$ C_6H_5

3.2.3 Исследование баклофена методом ВЭЖХ-УФ

При разработке ВЭЖХ-методики определения баклофена необходимо было подобрать оптимальные 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. Баклофен является амфолитом, так как содержит в молекуле одновременно кислотный и основной центр. Для получения оптимальных параметров удерживания необходимо создание такого значения pH ПФ, при котором молекулы данного вещества будут находиться преимущественно в одной ионной форме, что увеличивает хроматографический отклик и предотвращает размывание хроматографической зоны. Изoeлектрическая точка баклофена находится при значении pH 6.75.

В качестве модификатора ПФ для создания кислых значений pH была выбрана *o*-фосфорная кислота, т.к. ее растворы имеют минимальное поглощение в диапазоне длин волн 190-400 нм. Для создания щелочной среды элюента использовали сильное органическое основание – триэтиламин (pK_a 10,87).

Для стабилизации значения pH водного компонента ПФ использовали:

- раствор *o*-фосфорной кислоты, pH от 1.8 до 5.5;
- раствор гидрофосфата калия с *o*-фосфорной кислотой, pH от 1.8 до 5.5;
- фосфатный буферный раствор, pH 8.0;
- раствор триэтиламина, pH 9.5 и 7.5.

ВЭЖХ-анализ проводили в диапазоне pH 1.8-9.5, соответствующем рабочему диапазону большинства неполярных колонок для обращено-фазового варианта жидкостной хроматографии.

Установлено, что спектр раствора баклофена не изменяется в исследуемом диапазоне pH (рис. 14), а при использовании ПФ с pH 1.8 – 5.5 время удерживания баклофена и величина аналитического сигнала практически не изменяются при варьировании состава ПФ и величины pH.

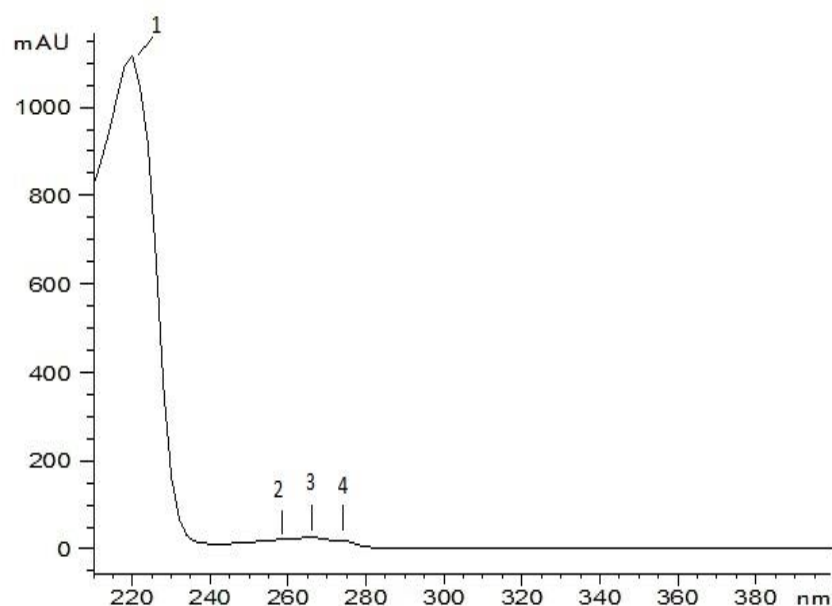


Рисунок 14 – УФ-спектр баклофена, полученный в ходе ВЭЖХ-анализа с использованием диодноматричного детектора, C 10 мг/дм³ (максимумы поглощения, нм: 1 – 220; 2 – 259; 3 – 266; 4 – 274)

При использовании фосфатного буферного раствора с рН 8.0 время удерживания баклофена приближается (с учетом погрешности) к времени удерживания его при рН<7 (табл. 4). Величина аналитического сигнала незначительно увеличивается при высоких концентрациях баклофена по сравнению с данными, полученными для рН<7.

Таблица 4 – Время удерживания баклофена при различных составах подвижных фаз

Состав подвижной фазы	рН	Время удерживания, мин
$H_3PO_4 + K_2HPO_4$	2.5	7.42 ± 0.01
H_3PO_4	3.5	6.30 ± 0.07
$K_2HPO_4 + Na_2HPO_4$	8.0	7.32 ± 0.03
триэтиламин	7.5	7.52 ± 0.02
триэтиламин	9.5	7.53 ± 0.01

Сравнение зависимости площади пика баклофена от его концентрации для различных значений pH представлены на рис. 15.

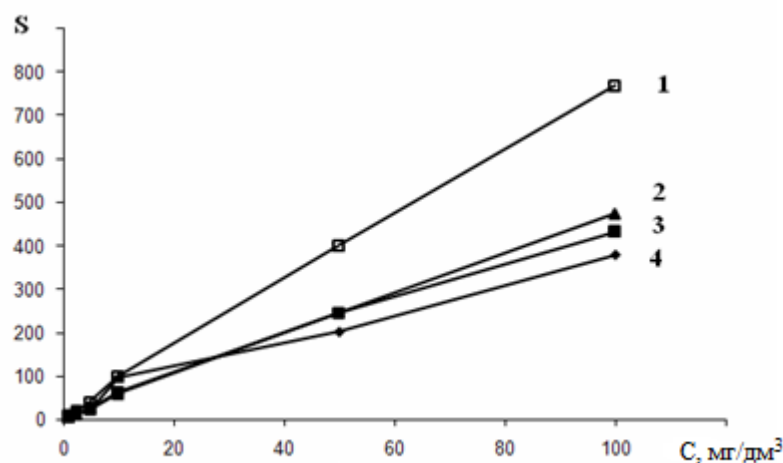


Рисунок 15 – Зависимость площади пика баклофена от его концентрации при различных значениях pH: 1 – 9.5; 2 – 8.0; 3 – 3.5; 4 – 2.5

На основании сравнения зависимости площади пика баклофена от концентрации сделан вывод о том, что самая высокая чувствительность наблюдается при использовании в качестве модификатора ПФ раствора триэтиламина.

Применение в качестве модификатора водного компонента ПФ раствора триэтиламина с pH 9.5 приводит к увеличению аналитического сигнала примерно в 2 раза по сравнению с величиной аналитического сигнала для подвижных фаз с pH < 7.

На рис. 16 приведена хроматограмма раствора баклофена, полученная в обращено-фазовом варианте метода жидкостной хроматографии с использованием раствора триэтиламина в качестве модификатора ПФ. Время удерживания баклофена составило 7.53 мин.

Валидацию аналитической методики проводили по следующим параметрам: линейность, правильность, повторяемость [7, 38, 39, 48, 75].

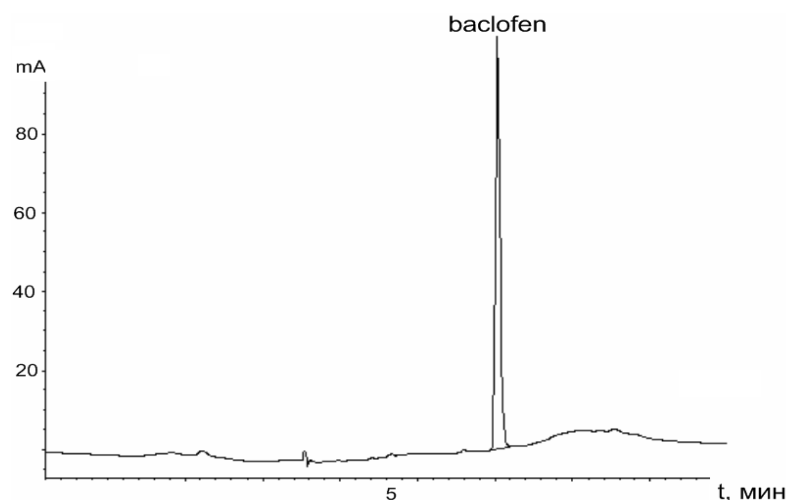


Рисунок 16 – Хроматограмма раствора баклофена, $\lambda=220$ нм, $C=20$ мг/дм³, подвижная фаза: ацетонитрил – раствор триэтиламина, рН 9.5

Линейность градуировочной зависимости доказана в диапазоне концентраций от 0.5 до 50 мг/дм³ (рис. 17). Уравнение зависимости аналитического сигнала от концентрации баклофена имеет вид следующего уравнения $y = 32.9867x - 22.2277$, а коэффициент корреляции составляет 0.9995.

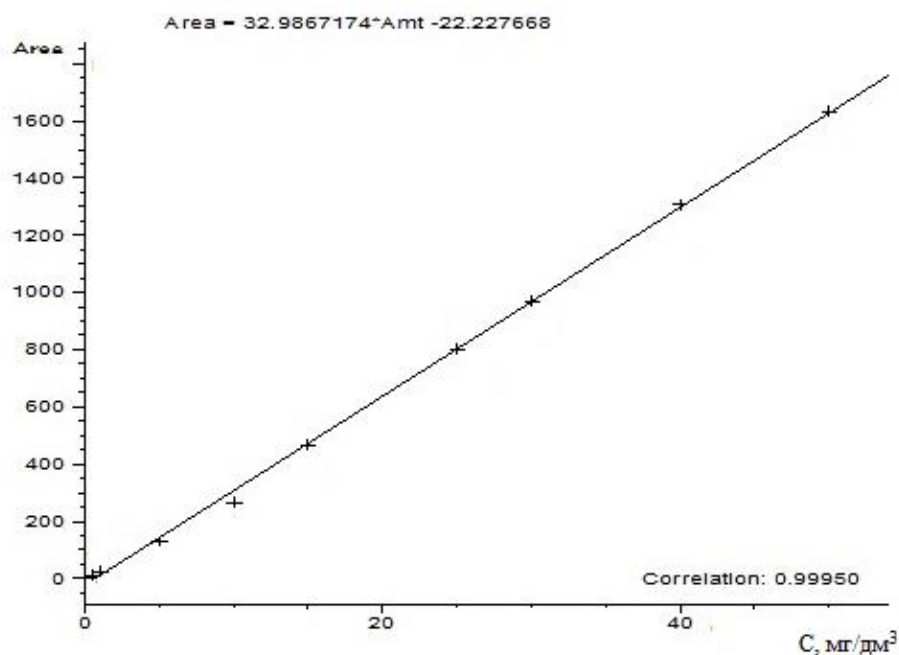


Рисунок 17 – Градуировочный график количественного определения баклофена методом ВЭЖХ

Проверку правильности методики проводили методом «введено-найдено» по девяти концентрационным уровням градуировочного графика в трех параллельных измерениях (табл. 5). Согласно представленным данным (табл. 5) отклонение от истинного значения составляет от 1.2 до 5.0%.

Таблица 5 – Оценка правильности и повторяемости методики количественного определения баклофена в модельных растворах

Введено, мг/дм ³	Найдено, мг/дм ³	$\bar{x}_{cp}$	S	$\Delta_{\bar{x}_{cp}}$	Отклонение от истинного значения, %
0.5	0.52 0.56 0.51	0.53	0.03	0.07	6
1	1.08 1.02 1.05	1.05	0.03	0.07	5
5	5.12 5.08 5.50	5.2	0.2	0.6	4
10	9.72 9.69 9.50	9.6	0.1	0.3	4
15	14.73 14.70 14.50	14.6	0.1	0.3	2.7
25	25.10 25.86 25.75	25.6	0.4	1.0	2.4

30	29.78	29.5	0.5	1.3	1.7
	29.88				
	28.93				
40	40.55	40.5	0.1	0.3	1.25
	40.34				
	40.58				
50	50.55	50.7	0.2	0.5	1.4
	50.72				
	50.93				

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.

3.2.4 Исследование баклофена методом ВЭЖХ-МС/МС

Учитывая низкие концентрации баклофена в крови, чувствительности метода ВЭЖХ с УФ-детектором может быть недостаточно для его определения, поэтому был применен метод ВЭЖХ с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС), отличающимся весьма высокой чувствительностью и возможностью с высокой селективностью определять нужный ион в области пг в режиме мониторинга заданного иона.

Тандемным называют масс-спектрометр, имеющий два масс-анализатора. Тандемные масс-спектрометры применяются, как правило, вместе с «мягкими» методами ионизации, при которых не происходит

фрагментации ионов анализируемых молекул (молекулярных ионов). Таким образом, первый масс-анализатор анализирует молекулярные ионы. Покидая первый масс-анализатор, молекулярные ионы фрагментируются под действием соударений с молекулами инертного газа или излучения лазера, после чего их фрагменты анализируются во втором масс-анализаторе. Селективность такого анализа значительно выше в режиме MRM – мониторинга множественных реакций, когда регистрируются ионы-продукты, образующихся из выбранных ионов-предшественников с определенными значениями m/z .

Для метода ВЭЖХ-МС/МС наиболее важным является подбор условий работы масс-спектрометра, нежели хроматографических условий. Так как в режиме MRM происходит регистрация различных ионов, то добиваться хроматографического разделения пиков, как для ВЭЖХ-УФ, уже не является основной целью подбора условий. Поэтому были выбраны хроматографические условия, подходящие для аминокислот.

С помощью программы обработки данных Analyst 1.5.2 (Applied BioSystem) были подобраны параметры MRM переходов для баклофена и внутреннего стандарта фенибута (табл. 6).

Таблица 6 – Параметры MRM переходов баклофена и фенибута

Вещество	MRM переход	DP, В	CE, эВ	CXP, В
баклофен	214 → 151	60	25	12
	214 → 179	60	28	12
	214 → 197	60	14	12
фенибут (внутренний стандарт)	180 → 163	60	13	13
	180 → 145	60	17	13
	180 → 117	60	27	13

где MRM – мониторинг множественных реакций (multiple reaction monitoring mode), DP – потенциал декластеризации (declustering potential), CE

– энергия соударений (collision energy), СХР – напряжение на выходе ячейки соударений (collision cell exit potential)

Определение концентрации баклофена проводили по наиболее интенсивному отклику пары ионов с m/z 214 $\rightarrow$ 151, отношение к площади пика внутреннего стандарта проводили по наиболее интенсивному отклику пары ионов фенибута с m/z 180 $\rightarrow$ 163.

При параметрах анализа, приведенных выше время, удерживания баклофена составило 3.58 мин, внутреннего стандарта фенибута – 2.91 мин (рис. 18). Минимально определяемая концентрация баклофена составила 1 мкг/дм³.

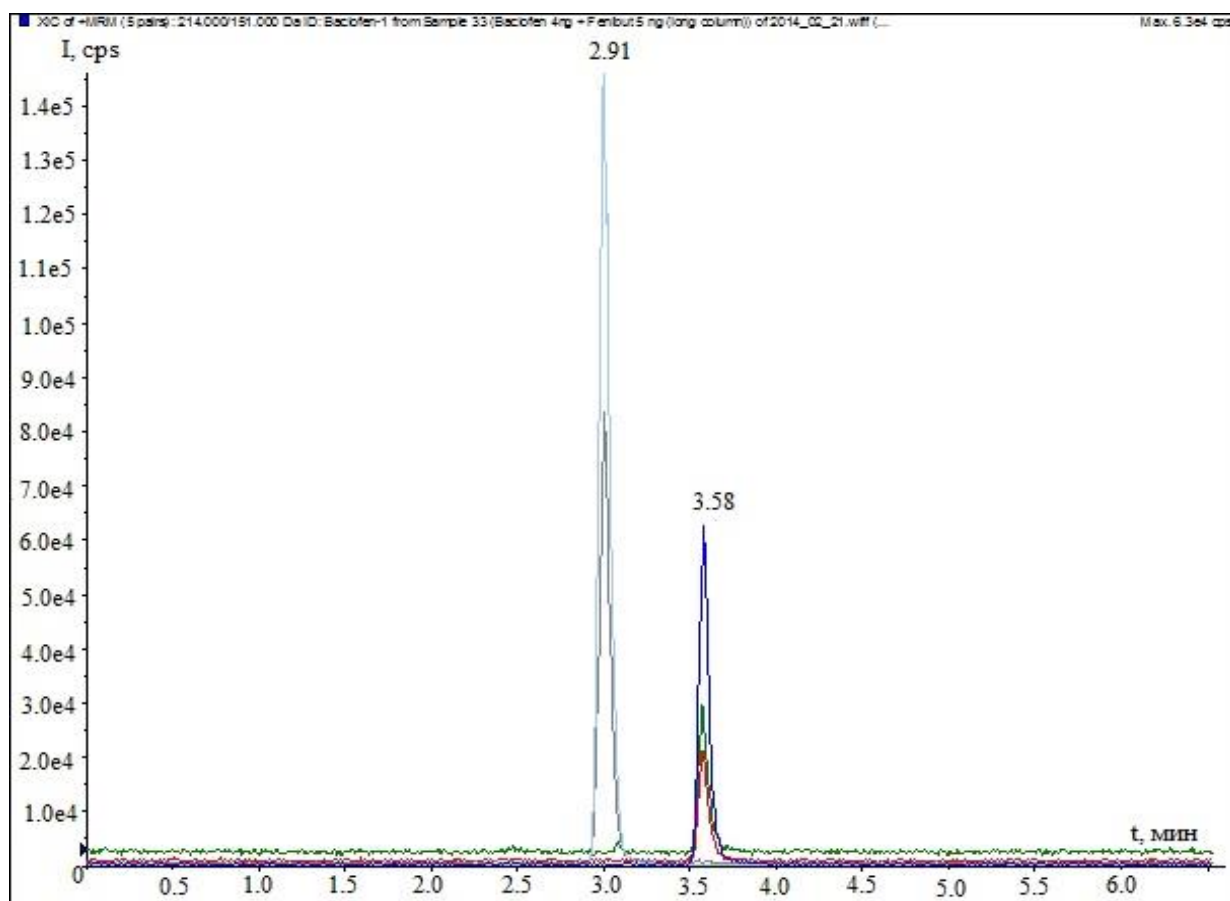


Рисунок 18 – Хроматограмма баклофена (время удерживания 3.58 мин, концентрация 4 мкг/дм³) и фенибут (время удерживания 2.91 мин, концентрация 5 мкг/дм³)

Масс-спектры фрагментов ионов-предшественников баклофена (m/z 214) и внутреннего стандарта фенибута (m/z 180) приведены на рис. 19.

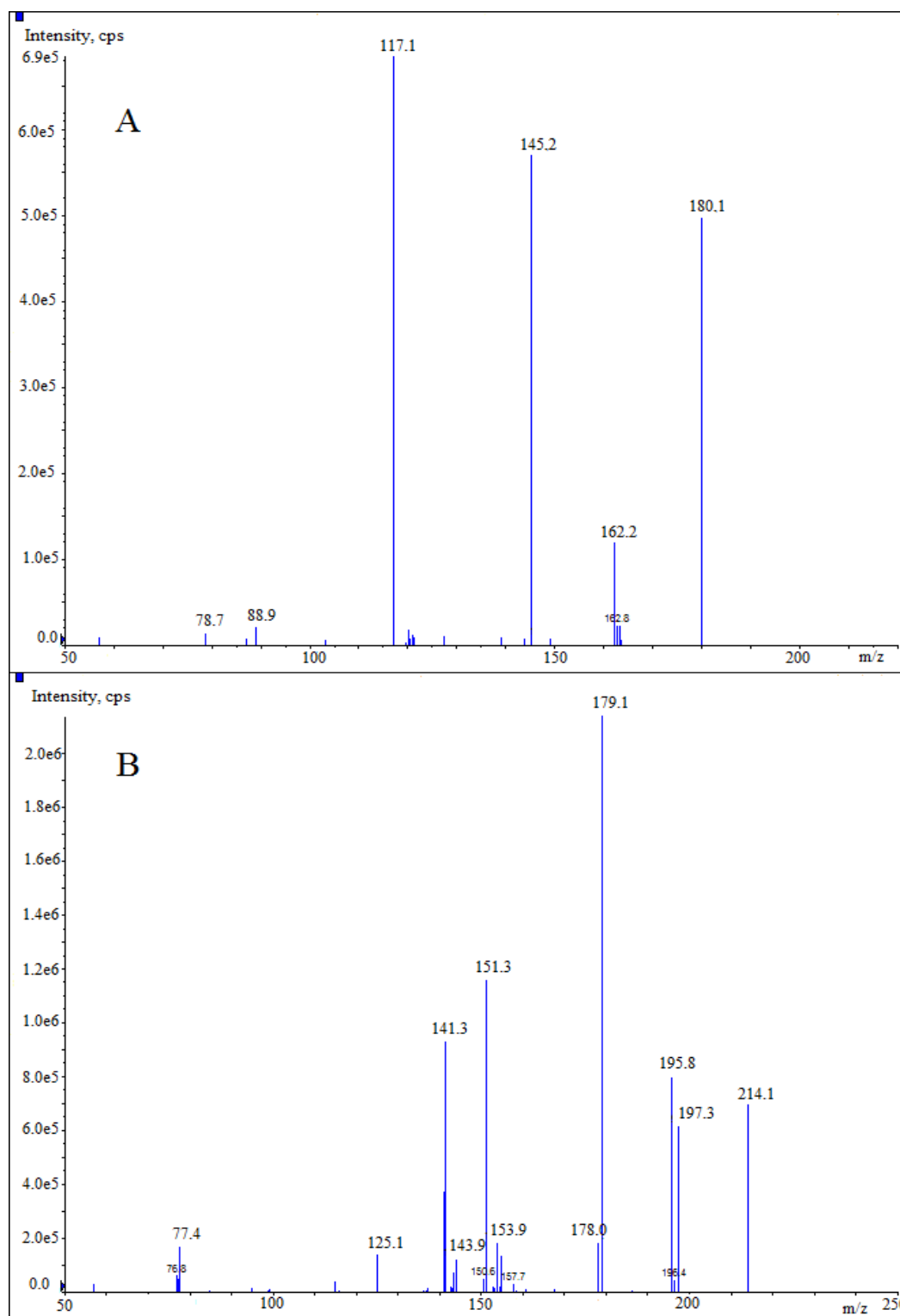


Рисунок 19 – Масс-спектры MS^2 внутреннего стандарта фенибута (А, ион-предшественник 180.1) и баклофена (В, ион-предшественник 214.1)

Таким образом, применение метода ВЭЖХ/МС-МС при выбранных условиях работы масс-спектрометра позволяют определять баклофен в модельных растворах за минимальное время на уровне концентраций мкг/дм^3 (нг/мл). Метод ВЭЖХ/МС-МС с применением выбранных условий был использован для разработки методики определения баклофена в крови.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКЛОФЕНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

4.1 Обнаружение баклофена при использовании методик ГХ/МС-скрининга.

Принимая во внимание физические свойства баклофена (малую растворимость в органических растворителях), описанные в литературном обзоре, методики изолирования лекарственных и наркотических веществ [10, 11, 16, 47, 52], основанные на их экстракции органическими растворителями, не подходят для изолирования баклофена из биологических объектов. Поэтому нами были использованы приемы пробоподготовки, применяемые в ХТА и СХИ, в которых используются элементы твердофазной экстракции и очистки экстрактов, а в качестве экстрагента используется ацетонитрил.

Методики ГХ/МС-скрининга, используемых в ХТА и СХИ для обнаружения наркотических средств и лекарственных веществ в биологических объектах, не адаптированы для обнаружения баклофена. В связи с этим, необходимо установить возможность определения баклофена с применением выбранных методик.

4.1.1 Обнаружение баклофена при использовании методики ГХ/МС-скрининга мочи 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 [27, 28].

1 мл мочи, предварительно проверенной на отсутствие лекарственных веществ, помещали в стеклянный флакон, прибавляли по 10, 20 и 50 мкл

раствора баклофена в 0.1М хлороводородной кислоте с концентрацией 1 г/дм³, тщательно перемешивали и добавляли по каплям 1 мл концентрированной хлороводородной кислоты (до pH 2.0), флаконы закрывали резиновыми пробками и фиксировали металлическими фиксаторами. Далее флаконы помещали в кипящую водяную баню и выдерживали 30 мин. После охлаждения жидкости до комнатной температуры прибавляли 3-4 капли трихлоруксусной кислоты и дважды экстрагировали по 2 мл гексана для удаления неполярных липофильных веществ. Затем водный слой отделяли и нейтрализовали гидрокарбонатом натрия до pH 6.5-7.0. Далее прибавляли 1-2 капли 25%-го раствора аммиака до pH 8.5-9.0 и дважды экстрагировали по 2 мл смеси бутанол - хлороформ (1:9) по 10 мин. Полученные органические извлечения отделяли, объединяли и выпаривали досуха во флаконе в токе теплого воздуха. Дериватизацию сухих остатков образцов мочи проводили по методике, описанной в гл. 2.

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. 20).

Минимально определяемая концентрация баклофена в моче по данной методике составила 50 мг/дм³, которую определяли как наименьшую концентрацию, при которой на хроматограмме идентифицировали хотя бы один из артефактов баклофена.

Идентифицированные вещества представляют собой продукты внутренней циклизации баклофена с элиминированием молекулы воды. Они образуются, как в результате действия водоотнимающих веществ, таких как уксусный ангидрид, так и при термическом воздействии в инжекторе газового хроматографа. Эти вещества являются маркерами присутствия баклофена в экстрактах при анализе их методом ГХ/МС.

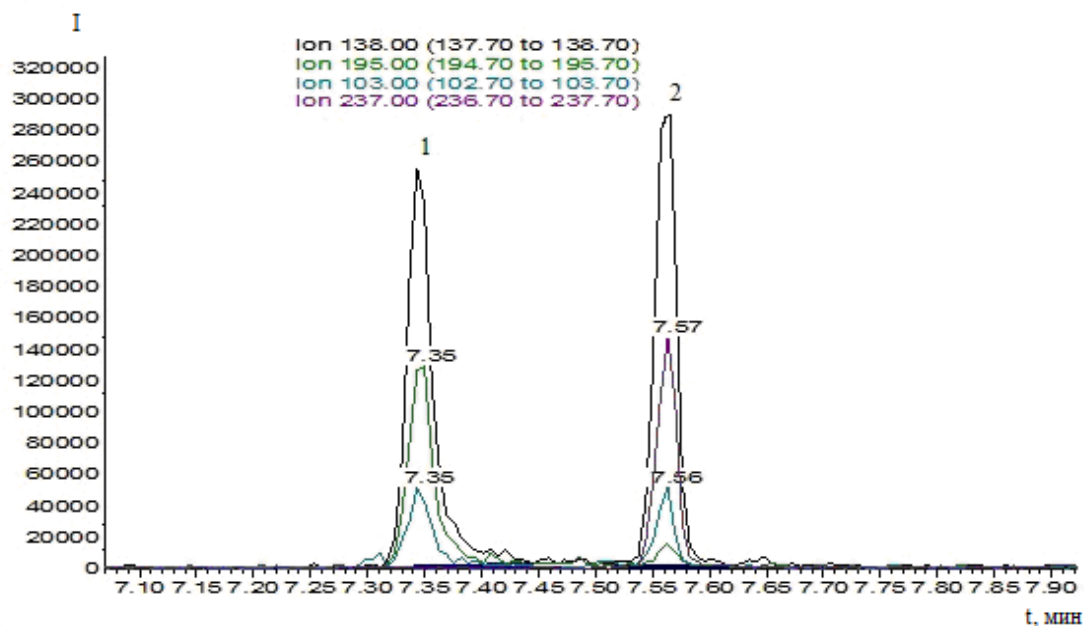


Рисунок 20 – Хроматограмма экстракта мочи, содержащей баклофен (C 100 mg/dm^3), после дериватизации уксусным ангидридом (1 – 4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинон; 2 – N-ацетил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинон)

Таким образом, при использовании методики скрининга мочи на наличие лекарственных и наркотических веществ методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором обнаружение баклофена возможно в виде 4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона и N-ацетил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона. Данная методика может быть использована для обнаружения и идентификации баклофена в моче, при этом количественное определение не представляется возможным, так как ацетилирование исследуемого соединения происходит не полностью.

4.1.2 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 [29] с применением наборов VetexQ Тох. В состав набора входит полипропиленовая пробирка для экстракции объемом 50 мл, содержащая $MgSO_4$ и $NaCl$ для создания буферной системы, и полипропиленовая пробирка для очистки экстракта объемом 15 мл, содержащая $MgSO_4$ и сорбент C_{18} .

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 Тох, прибавляли 50 мкл раствора этилморфина с концентрацией 0.1 г/дм³ (внутренний стандарт) и 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 Тох. 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 °С в течение 30 мин. По окончании реакции избыток реактивов выпаривали досуха в токе воздуха при температуре не выше 50 °С. Сухие остатки растворяли в 0.2 мл этилацетата и исследовали методом ГХ/МС.

Как и в случае определения баклофена по методике скрининга мочи по ацетилированным производным, при исследовании экстрактов органов методом ГХ/МС после ацетилирования на хроматограммах идентифицировали два пика: 4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинон и N-ацетил-4-

(4-хлорфенил)-2-пирролидинон с временами удерживания 7.26 мин и 7.43 мин соответственно (рис. 21).

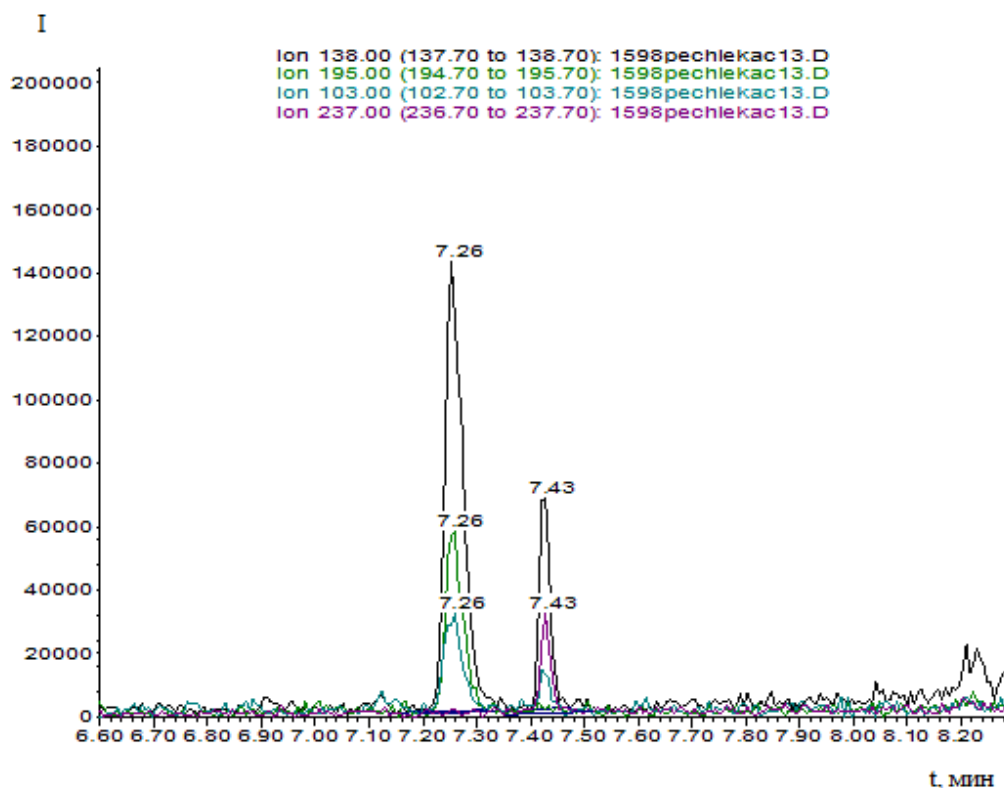


Рисунок 21 – Хроматограмма экстракта печени, содержащей баклофен, по выбранным ионам с m/z 138, 195, 103, 237

Методика экстракции из внутренних органов с использованием наборов VetexQ Тох и анализ экстрактов методом ГХ/МС подходит для обнаружения и идентификации баклофена в органах, при этом количественное определение баклофена невозможно, так как из одного соединения образуется два артефакта с переменным их соотношением.

4.2 Разработка методики количественного определения 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.

Ввиду нерастворимости баклофена в органических растворителях методики, основанные на жидкость-жидкостной экстракции, для извлечения баклофена не подходят. Поэтому решено было ввести в пробоподготовку элементы твердофазной экстракции, а в качестве экстрагента использовать ацетонитрил.

Пробоподготовку образцов мочи для исследования методом ВЭЖХ проводили в лаборатории судебно-химического отделения ККБСМЭ следующим образом: к 1 мл мочи прибавляли 1 мл ацетонитрила (Panreac, 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, содержание С 24%) 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.

Схема пробоподготовки образцов мочи для исследования на наличие баклофена методом ВЭЖХ-УФ приведена на рис. 22.

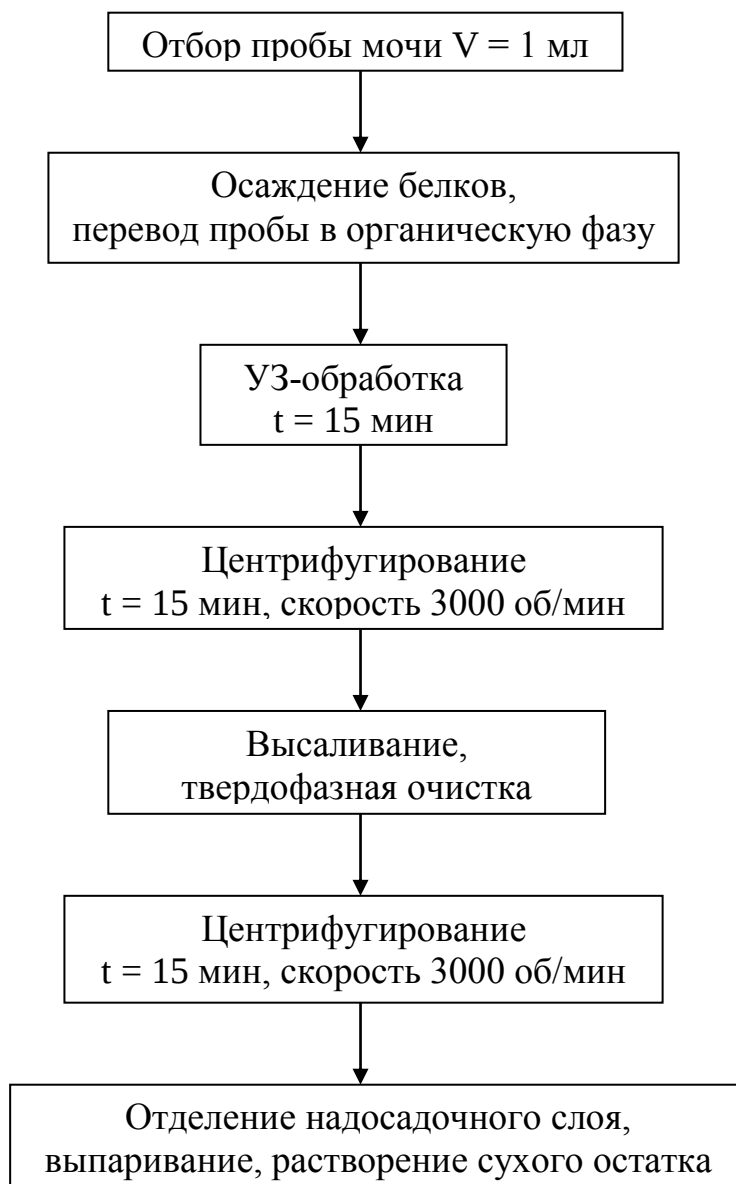


Рисунок 22 – Схема пробоподготовки образцов мочи для исследования на наличие баклофена методом ВЭЖХ-УФ

Пробоподготовку образцов мочи для построения градуировочного графика проводили следующим образом: по 1 мл мочи, предварительно проверенной на отсутствие лекарственных веществ, помещали в стеклянные флаконы объемом 15 мл, прибавляли по 2, 5, 7, 10, 12 и 15 мкл исходного раствора баклофена в 0.1 М хлороводородной кислоте с концентрацией 10 г/дм³, перемешивали, далее проводили пробоподготовку аналогично исследуемым образцам.

Методика валидирована по показателям специфичности, линейности, правильности, повторяемости, пригодности хроматографической системы, предел количественного определения [7, 38, 39, 48, 75].

Специфичность методики подтверждали, исследуя образцы мочи, содержащей баклофен, и в его отсутствии. Идентификацию пика баклофена проводили по времени удерживания (6.18 мин, рис. 23) и УФ-спектру. Хроматограмма образца мочи, не содержащей баклофен, приведена на рис. 24. Из рисунков видно, что методика отличается высокой специфичностью, что подтверждается отсутствием пиков эндогенных соединений в месте элюирования баклофена.

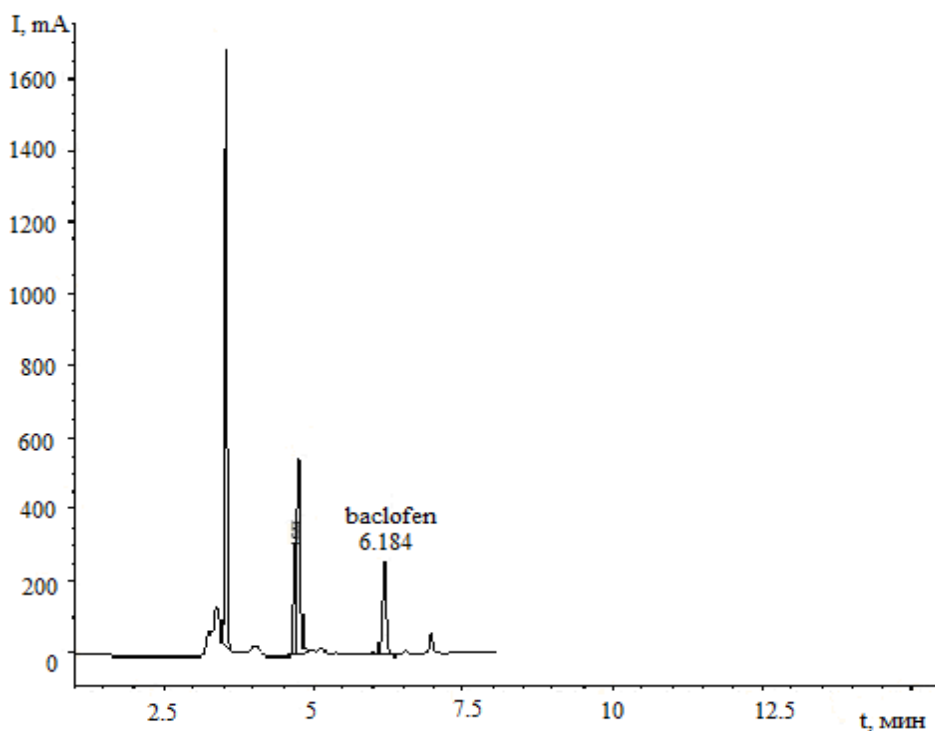


Рисунок 23 – Хроматограмма образца мочи с добавлением баклофена, концентрация баклофена 20 мг/дм³

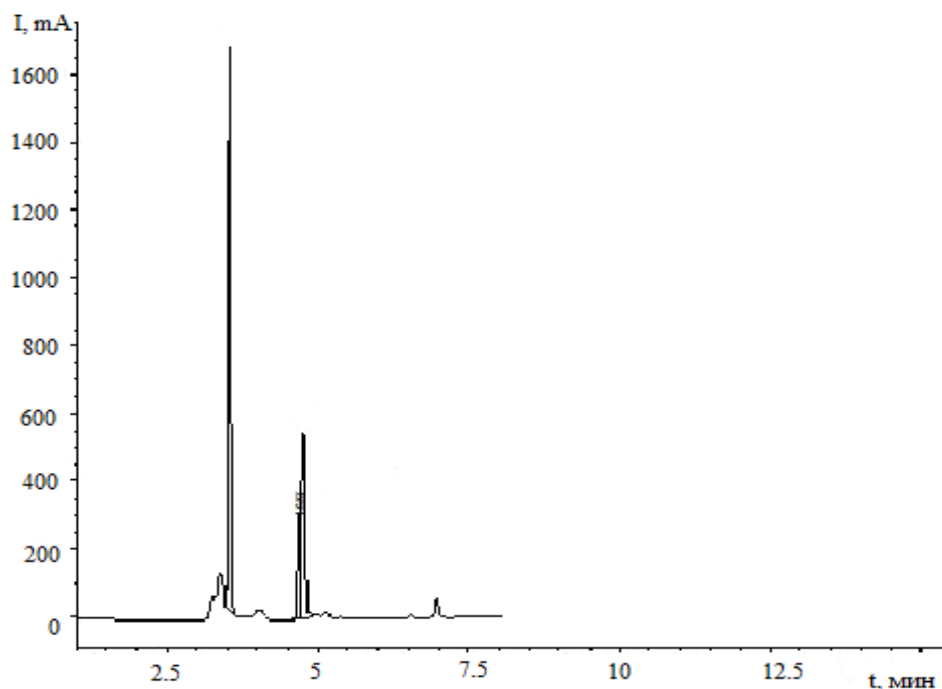


Рисунок 24 – Хроматограмма образца мочи, не содержащей баклофен (холостой образец)

Проверку *пригодности хроматографической системы* проводили путем оценки не менее 3-х хроматограмм. Среднее число теоретических тарелок составило 10750 ± 814 , коэффициент асимметрии пика баклофена – 1.13 ± 0.03 , что свидетельствует о высокой эффективности хроматографической системы.

Линейность методики доказана в диапазоне концентраций от 2 до 150 мг/дм³ (рис. 25). Уравнение зависимости аналитического сигнала от концентрации баклофена имеет вид $y = 29.078x - 20.233$, коэффициент корреляции 0.99966.

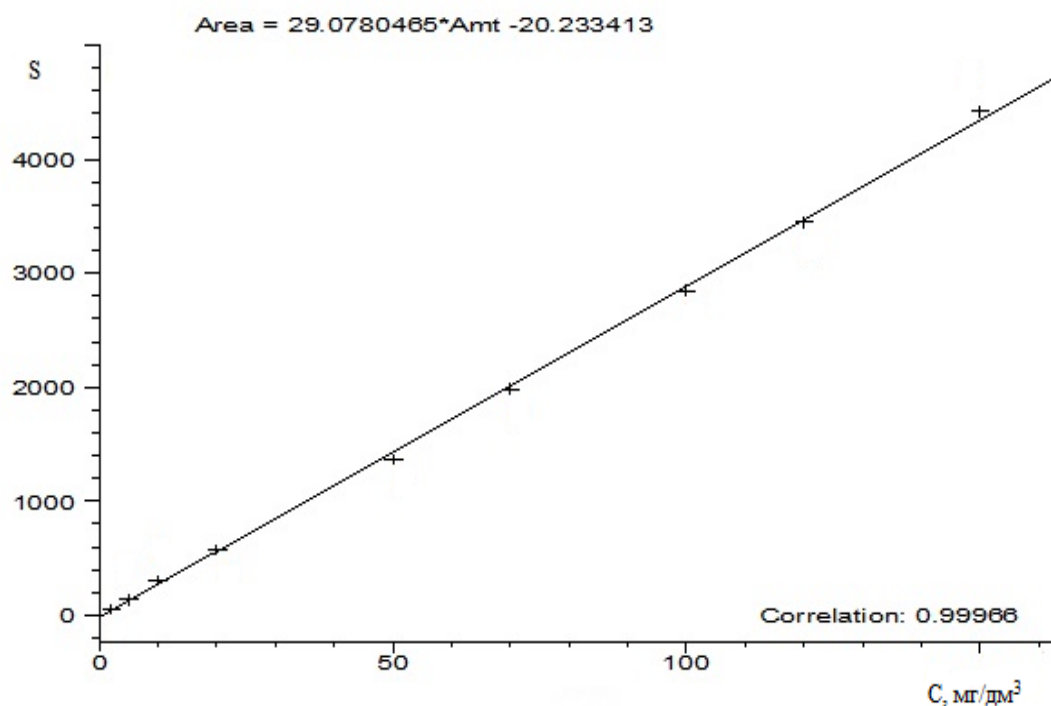


Рисунок 25 – Градуировочный график для определения баклофена в моче, по оси абсцисс – концентрация баклофена, мкг/мл; по оси ординат – отклик прибора в относительных единицах интегрирования

Для оценки *повторяемости методики* проводили 5-кратное количественное определение баклофена в модельном образце мочи, содержащем 70 мг/дм³ баклофена (табл. 7).

Таблица 7 – Оценка повторяемости методики количественного определения баклофена в моче

x_i , мг/дм ³	x_{cp} , мг/дм ³	S	S_n , %	$x_{cp} \pm \Delta_{x_{cp}}$
69.11	70.3	0.8	1.11	70.3 ± 0.1
70.03				
71.20				
70.28				
70.69				

Правильность методики устанавливали методом «введено-найдено» по девяти концентрационным уровням градуировочного графика в трех параллельных измерениях (табл. 8-9) и путем добавок баклофена к различным образцам мочи. Согласно представленным данным, отклонение от истинного значения составляет от 0.7 до 10%.

Таблица 8 – Оценка правильности методики количественного определения баклофена в моче

Введено, мг/дм ³	Найдено, мг/дм ³	x_{cp} , мг/дм ³	S	Sr , %	Δx_{cp}	Отклонение от истинного, %
2.0	2.22 2.19 2.20	2.20	0.02	0.69	0.04	10
5.0	5.35 5.22 5.15	5.2	0.1	1.9	0.3	4.8
10.0	9.65 9.42 9.82	9.6	0.2	2.1	0.5	4
20.0	21.08 20.55 20.74	20.8	0.3	1.3	0.7	4
50.0	48.65 48.15 48.22	48.3	0.3	0.6	0.7	3.4
70.0	68.41 68.03 68.66	68.4	0.3	0.5	0.8	2.3

100.0	98.32	98	1.5	1.5	3.7	2
	98.93					
	96.09					
120.0	118.62	118.2	0.9	0.8	2.4	1.5
	117.13					
	118.91					
150.0	151.28	149	2	1	5	0.7
	144.97					
	148.92					

Таблица 9 – Проверка правильности разработанной методики с помощью метода «введено-найдено»

Образец	Концентрация баклофена в образце, мг/дм ³	Введено, мг/дм ³	Концентрация баклофена с добавкой, мг/дм ³	Найдено, мг/дм ³
Образец мочи 1	107.6±5.2	10	116.8±4.4	9.5±0.5
Образец мочи 2	92.3±3.5	20	112.9±2.5	20.6±0.8
Образец мочи 3	11.6±0.6	50	61.0±0.6	49.4±0.9
Образец мочи 4	0	70	69.5±1.1	69.5±1.1

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.

Преимущества методики количественного определения баклофена в моче представлены в табл. 10.

Таблица 10 – Основные преимущества методики количественного определения баклофена в моче

Характеристика методики	За счет чего достигается эффект
экспрессность	- число операций при пробоподготовке не более 7; - минимальное время ВЭЖХ-анализа
устранение мешающего влияния	- введение элементов твердофазной очистки и высаливания при пробоподготовке; - подбор условий ВЭЖХ-анализа
дешевизна	- использование доступных реагентов и оборудования
надежность идентификации	- за счет использования диодно-матричного детектора

4.3 Разработка методики количественного определения баклофена в крови методом ВЭЖХ-МС/МС

Для токсикологической оценки важно определение концентрации баклофена в крови. Поскольку концентрация баклофена в крови относительно невелика, чувствительности метода ВЭЖХ-УФ не достаточно для ее определения, поэтому для количественного определения баклофена в крови была разработана методика ВЭЖХ с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ/МС-МС), селективность и чувствительность которой позволяют определять незначительные количества исследуемых веществ [93].

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. В связи с этим можно предположить, что показатели извлечения из биологических объектов и удерживания на хроматографической колонке для баклофена и фенибута будут схожи.

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 вials и добавляли 980 мкл дистиллированной воды. При превышении концентрации баклофена верхней границы градуировочного графика в реальных образцах крови применяли прием разбавления.

Для построения градуировочного графика использовали трупную кровь, предварительно проверенную на отсутствие лекарственных веществ. Пробоподготовку образцов крови для построения градуировочного графика проводили следующим образом: по 1 мл крови помещали в стеклянные флаконы объемом 15 мл, прибавляли по 5, 10, 25, 50, 75, 100 мкл водного раствора баклофена (Sigma, США) с концентрацией 0.01 г/дм³, перемешивали, далее проводили пробоподготовку аналогично исследуемым образцам. Для получения более высоких концентраций баклофена в крови (0.0015, 0.002, 0.0025, 0.003 и 0.004 г/дм³) использовали водный раствор баклофена с концентрацией 0.1 г/дм³.

Идентификацию пика баклофена проводили по времени удерживания заданных пар ионов (родительский ион – дочерний ион). При параметрах анализа, определенных для модельных растворов баклофена, время удерживания баклофена составило 3.59 мин, а фенибута – 2.95 мин (рис. 26).

Определение концентрации баклофена проводили по наиболее интенсивному отклику пары ионов с m/z 214 $\rightarrow$ 151, отношение к площади пика внутреннего стандарта проводили по наиболее интенсивному отклику пары ионов фенибута с m/z 180 $\rightarrow$ 163.

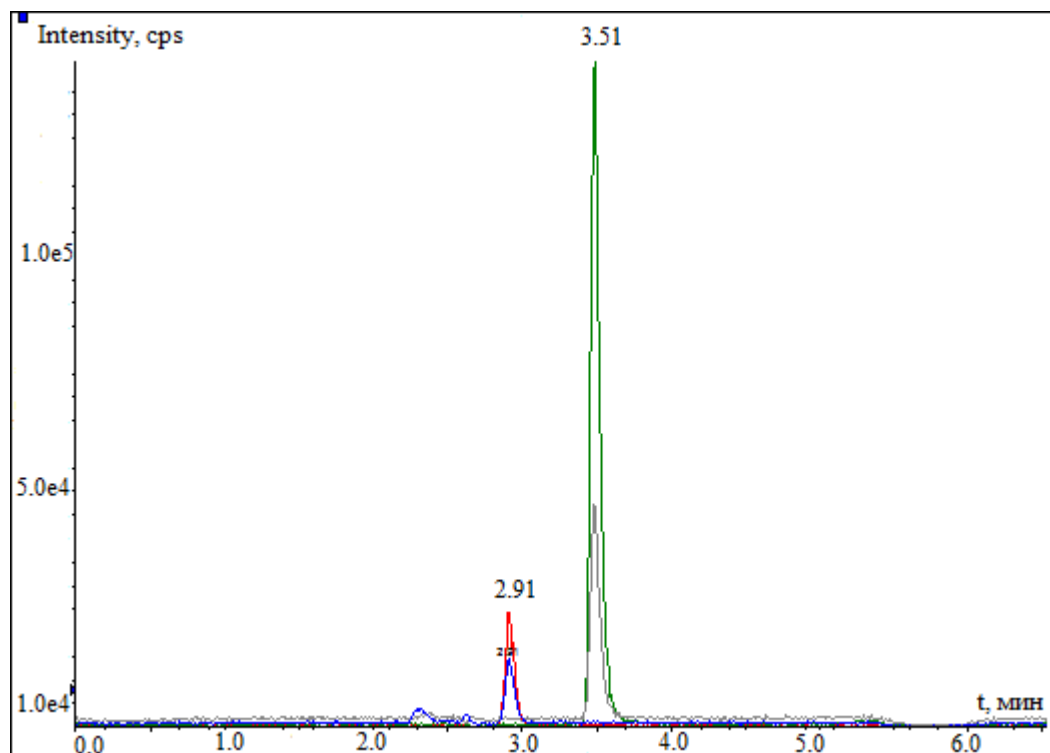


Рисунок 26 – MRM хроматограмма образца крови с добавлением баклофена, концентрация баклофена 25 мкг/дм³

Ввиду высокой селективности метода за счет MRM режима методика пробоподготовки заключается в осаждении белков и эритроцитов с помощью трихлоруксусной кислоты, дополнительной очистки не требуется, зато потребовалось дополнительное разведение из-за высокой чувствительности метода.

Метрологическую оценку пригодности методики проводили аналогично как в случае с методикой для мочи по показателям специфичность, линейность, правильность, повторяемость, предел обнаружения, предел количественного определения.

Специфичность методики подтверждали отсутствием пиков эндогенных соединений в месте элюирования баклофена, хроматограмма образца крови, не содержащей баклофен, приведена на рис. 27. Из рисунков видно, что методика отличается высокой специфичностью, что подтверждается отсутствием пиков эндогенных соединений в месте элюирования баклофена.

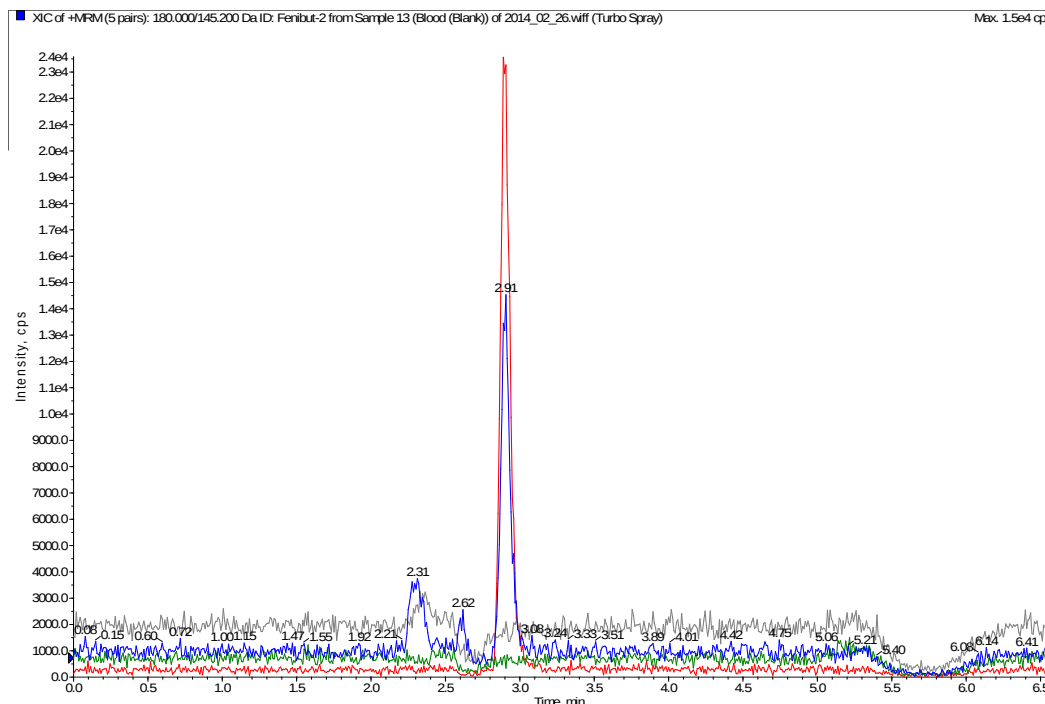


Рисунок 27 – MRM хроматограмма образца крови, не содержащей баклофена (холостой образец)

Предел количественного определения баклофена в крови составил 5 мкг/дм³, который рассчитывали как наименьшую концентрацию баклофена, при которой отношение сигнал – шум составляло 10:1.

Линейность градуировочного графика для определения баклофена в крови доказана в диапазоне концентраций от 50 до 4000 мкг/дм³ (рис. 28), который можно определить как аналитическую область методики. Уравнение зависимости аналитического сигнала от концентрации баклофена в крови имеет вид $y = 0.0232 x + 0.0931$, коэффициент корреляции 0.9997.

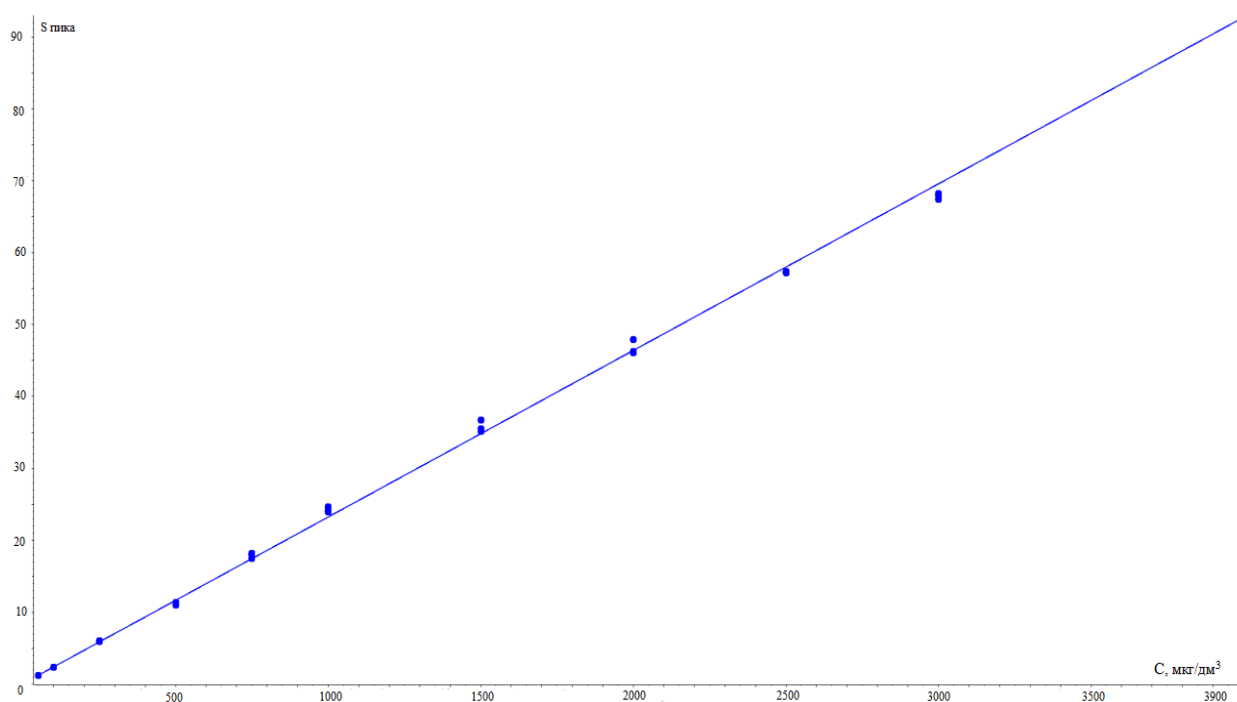


Рисунок 28 – Градуировочный график для определения баклофена в крови

Для оценки *повторяемости методики* проводили 5-кратное количественное определение баклофена в модельном образце крови, содержащем 100 мкг/дм³ баклофена (табл. 11).

Таблица 11 – Оценка повторяемости методики количественного определения баклофена в крови

x_i , мкг/дм³	x_{cp} , мкг/дм³	S	S_n , %	$x_{cp} \pm \Delta x_{cp}$
96.5	96.9	0.7	0.7	96.9 ± 0.8
97.2				
97.7				
96.0				
97.3				

Оценку *правильности методики* проводили методом «введено-найдено» по одиннадцати концентрационным уровням градуировочного графика в трех параллельных измерениях и путем добавок баклофена к

различным образцам крови (табл. 12-13). Согласно представленным данным, отклонение от истинного значения находится в пределах до 5%.

Таблица 12 – Оценка правильности и повторяемости методики количественного определения баклофена в крови

Введено, мкг/дм ³	Найдено, мкг/дм ³	X _{среднее} , мкг/дм ³	S	Sr, %	ΔX	Отклонение от истинного%
50	48.1 48.6 48.3	48.3	0.3	0.5	0.6	3.4
100	96.9 97.2 96.3	96.8	0.5	0.5	1.1	3.2
250	263 254 257	258	5	1.8	11	3.2
500	517 510 519	515	5	0.9	12	3.0
750	773 781 762	772	10	1.2	24	2.9
1000	1022 1018 1044	1028	14	1.4	35	2.8
1500	1531 1552 1516	1533	18	1.2	44	2.2

Продолжение таблицы 12

2000	2005 2035 2060	2033	28	1.4	68	1.65
2500	2478 2455 2441	2458	19	0.8	46	1.68
3000	2943 2961 2978	2961	18	0.6	43	1.3
4000	3990 4010 4015	4005	13	0.3	32	0.125

Таблица 13 – Проверка правильности разработанной методики с помощью метода «введено-найдено»

Образец	Концентрация баклофена в образце, мкг/дм ³	Введено, мкг/дм ³	Концентрация баклофена с добавкой, мкг/дм ³	Найдено, мг/дм ³
Образец крови 1	112.0±1.6	100	211.0±1.9	99.0±1.7
Образец крови 2	81.6±1.3	500	593±15	511±14
Образец крови 3	32.2±0.9	1000	1052±24	1020±24
Образец крови 4	0	1500	1532±41	1532±41

Таким образом, разработанная методика количественного определения баклофена в крови характеризуется специфичностью, линейностью, правильностью, повторяемостью, низким пределом количественного определения и небольшим временем проведения анализа. Преимущества

методики количественного определения баклофена в моче представлены в табл. 14.

Таблица 14 – Основные преимущества методики количественного определения баклофена в крови

Характеристика методики	За счет чего достигается эффект
экспрессность	- минимальное число операций при пробоподготовке; - наименьшее время ВЭЖХ-анализа за счет подобранных условий (до 5 мин)
высокая специфичность, полное отсутствие мешающего влияния	- использование масс-спектрометра с тройным квадруполом в качестве детектора; - подбор параметров MRM-режима
низкий предел количественного определения	- использование MRM-режима работы масс-спектрометра с тройным квадруполом

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

На рис. 29 проиллюстрирован общий подход к ненаправленному исследованию биологических объектов на наличие баклофена.

В СХИ и ХТА часто возникают задачи анализа биологических объектов, направленных от лиц с отравлением неизвестным веществом. Для принятия во внимание возможное отравление баклофеном необходимо проводить исследование с учетом методик, подходящих для обнаружения, идентификации и количественного определения баклофеном.

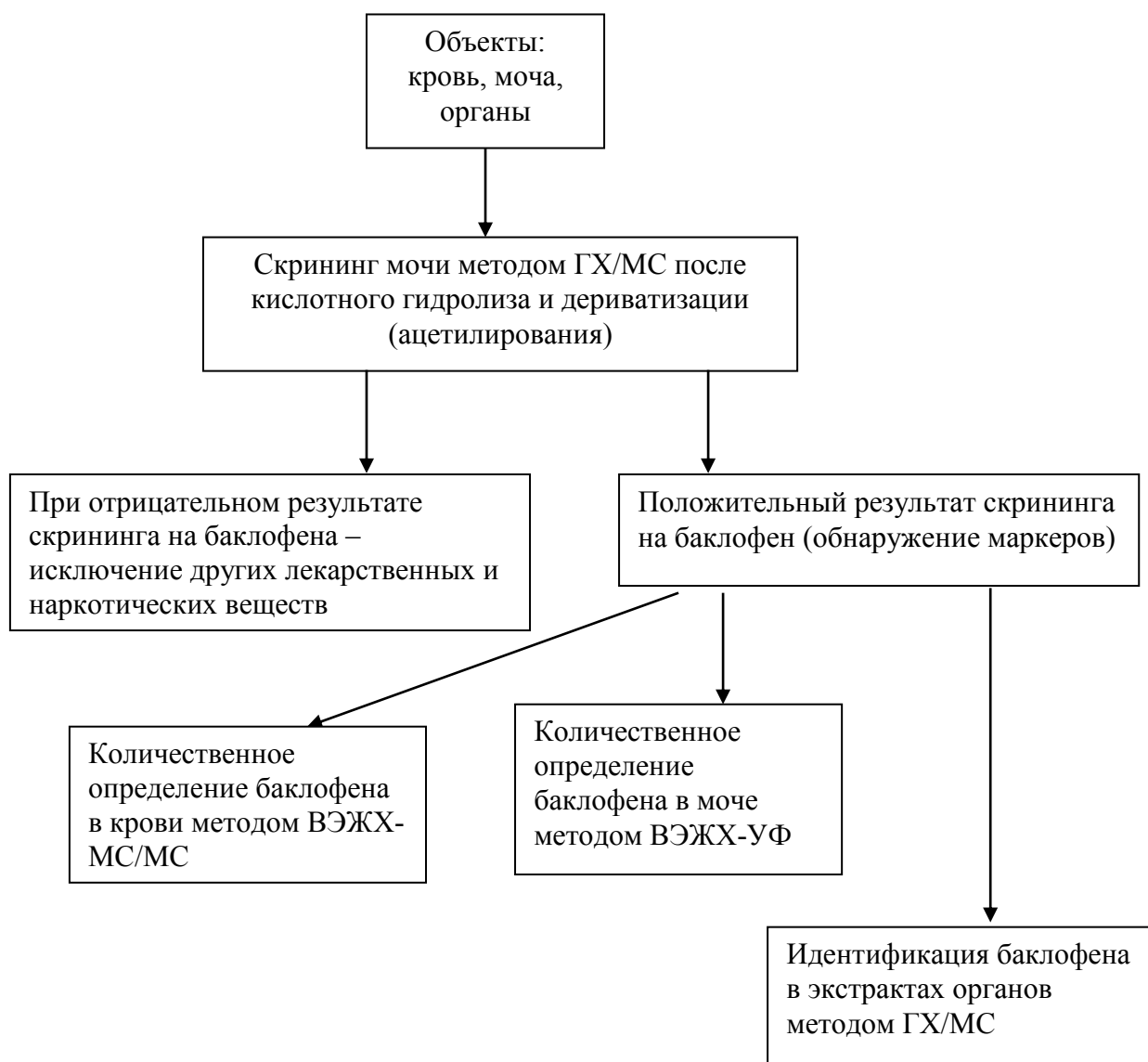


Рисунок 29 – Общая схема исследования биологических объектов при ненаправленном анализе на наличие баклофена

Химиико-токсикологическое исследование на наличие баклофена включает в себя только анализ биожидкостей пациента.

Судебно-химическое исследование может осложняться недостаточностью или отсутствием некоторых объектов для анализа. При отсутствии определенных объектов анализа (моча, органы) реализуются отдельные звенья указанной схемы.

4.5 Применение разработанных методик для определения баклофена в образцах биологических объектов

С использованием разработанных методик количественного определения баклофена в крови и моче проведено исследование образцов биожидкостей, полученных от лиц, поступивших в отделение отделении острых отравлений КМКБСМП в период 1.01.13 – 10.01.14 г. Результаты исследования приведены в табл. 15.

Таблица 15 – Результаты исследования биожидкостей лиц с подозрением на отравление баклофеном

№	Дата поступления	Результаты скрининга мочи методом ГХ/МС	Концентрация баклофена, мг/дм ³	
			кровь	моча
1	11.02.13	-	0.078	540.5
2	12.02.13	парацетамол	0.048	
3	24.02.13	метоклопрамид, анальгин	0.112	57.8
4	17.03.13	-	1.120	89.9
5	23.03.13	амфетамин, оксазепам, теofilлин, тиаприд, кардиамин, дроперидол	0.032	34.9
6	29.03.13	хинин	0.112	70.5
7	29.03.13	парацетамол, хинин, метоклопрамид	0.082	59.7
8	10.04.13	-	2.530	241.1
9	13.04.13	-	-	3.3
10	14.05.13	-	0.150	18.9
11	21.06.13	-	0.824	100.8
12	19.07.13	-	0.613	47.2
13	29.08.13	-	0.596	6.0

14	17.09.13	AB-FUBINACA	0.373	549.9
15	20.11.13	-	0.762	144.3
16	20.11.13	-	0.601	97.5
17	25.11.13	-	-	11.6
18	25.12.13	-	0.667	-
19	25.12.13	-	0.748	-
20	9.01.14	-	0.826	107.6
21	24.11.13	-	0.234	40.8

За 2013 г в отделении острых отравлений ГК БСМП зафиксировано 21 случай отравления баклофеном, что подтверждено результатами химико-токсикологического исследования крови и мочи пациентов, а также клиническими признаками, характерными для отравления баклофеном.

В нескольких случаях, наряду с баклофеном, в моче пациентов обнаружилось присутствие других лекарственных и наркотических препаратов, таких как парацетамол, метаклопрамид, амфетамин и др. Концентрация баклофена в моче пациентов варьировалась в диапазоне 3.3-549.9 мг/дм³, а в крови – в диапазоне 32-2530 мкг/ дм³. Согласно литературным данным, токсическая концентрация баклофена в сыворотке крови составляет 1.1-3.5 мг/дм³ [62, 74]. Исходя из этого концентрация баклофена в образцах 4 и 8 соответствует токсической.

Большая разница в определяемых концентрациях баклофена в крови и моче подтверждает необходимость применения ВЭЖХ-методик с различными способами детектирования.

Для уточнения и подтверждения диагноза отравления баклофеном необходим экспрессный химико-токсикологический анализ, что позволит определить тактику ведения пациентов, повысить качество лечения, следовательно, и прогноз на выздоровление.

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, женщина выпила 50 таблеток баклофена по 25 мг.

Исследование внутренних органов трупа проводили по методике, описанной в п.п. 4.1.2. При исследовании экстрактов органов методом ГХ/МС на хроматограмме идентифицировали пики 4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона и N-ацетил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона, которые являются маркерами присутствия баклофена.

Исследование крови гр. В. на наличие баклофена проводили методом ВЭЖХ-МС/МС по методике, описанной в п.п. 4.3. Учитывая, что концентрация баклофена в крови гр. В. оказалась выше аналитической области разработанной методики, повторный анализ был проведен из 0.2 мл исследуемой крови, разбавленной дистиллированной водой до объема 1 мл.

Концентрация баклофена в крови гр. В. была определена после разбавления исследуемой крови и составила 6650 мкг/дм³ (6.65 мг/дм³), что превышает токсическую концентрацию, из чего можно сделать вывод, что смерть наступила вследствие острого отравления баклофеном. Хроматограмма экстракта крови гр. В. приведена на рис. 30.

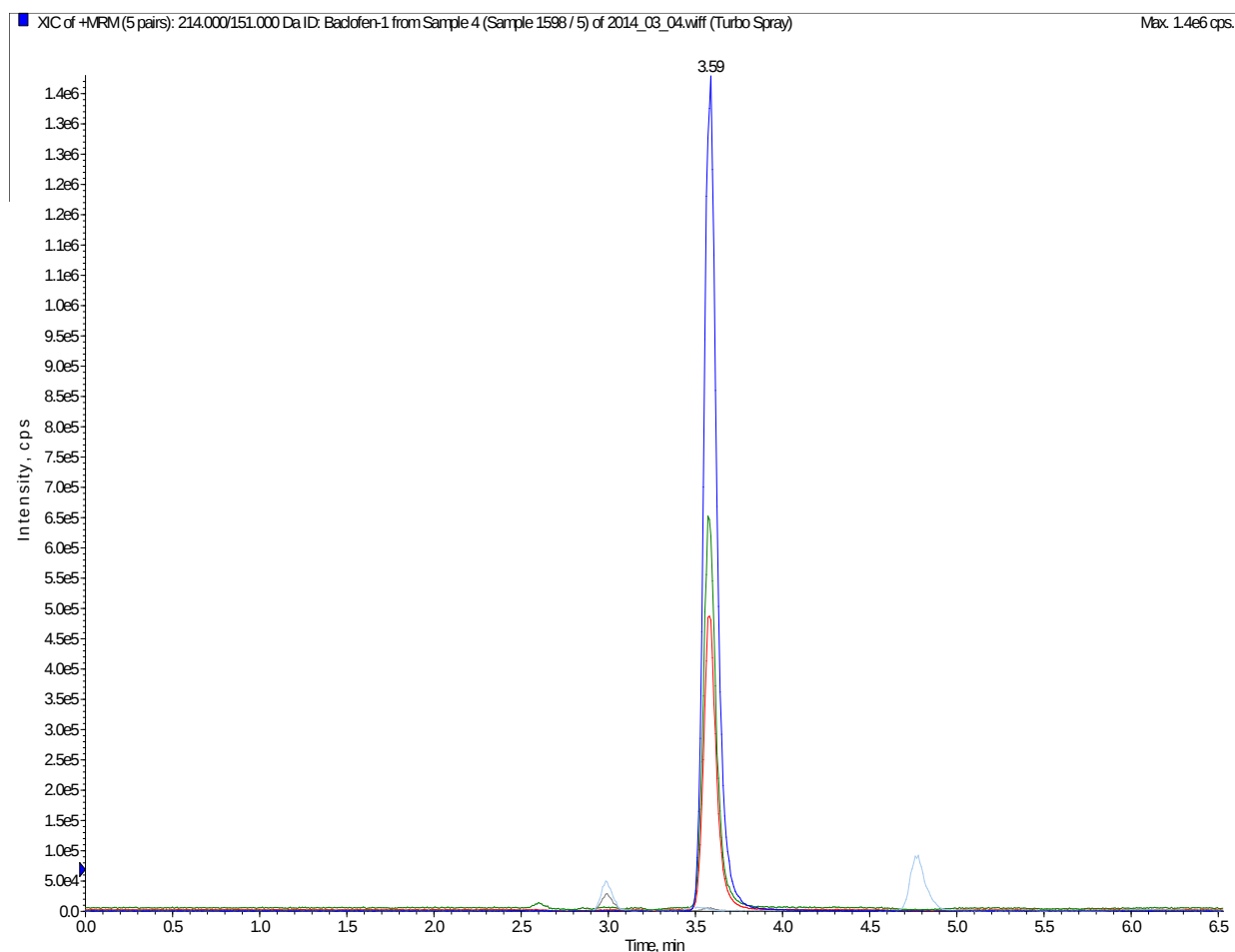


Рисунок 30 – MRM-хроматограмма экстракта крови гр. В.

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 pH на определение баклофена методом ВЭЖХ/УФ. Подобраны параметры MRM-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 химикотоксикологического исследования биологических объектов на наличие баклофена. Разработано информационное письмо для определения баклофена в биологических объектах.

Благодарности

Автор выражает искреннюю признательность д.фарм.н., профессору кафедры фармацевтической химии СибГМУ Е.А. Краснову за фактическое руководство диссертационной работой и неоценимую помощь в проведении исследований, обсуждении, оформлении и публикации результатов;

научному руководителю д.х.н., профессору кафедры химии ПИ СФУ А.А. Ефремову за помощь в выполнении диссертационной работы;

заведующему судебно-химического отделения ОГУЗ «Челябинское областное бюро судебно-медицинской экспертизы» к.х.н. А.Б. Мелентьеву за консультации в области судебной химии и помощь в проведении исследований;

начальнику КГБУЗ «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы» А.В. Донскому и заведующему судебно-химического отделения к.х.н. Г.А. Слащину за предоставление возможности проведения исследований на базе судебно-химического отделения;

судебному эксперту-химику высшей квалификационной категории Е.В. Суворовой за помощь в проведении исследований;

заведующему отдела газожидкостной, жидкостной и времяпролетной масс-спектрометрии Центральной научно-исследовательской лаборатории Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава РФ к.м.н. М.Ю. Котловскому за помощь в проведении ВЭЖХ-МС/МС анализа баклофена;

заведующей отделением острых отравлений КМКБСМП им. Н.С. Карповича Шивриной Т.Г. за предоставление биологического материала и консультации в области диагностики отравлений баклофеном.

Список литературы

1. Арзамасцев, А. П. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в анализе лекарственных препаратов / А. П. Арзамасцев, Д. Б. Никуличев, Д. М. Попов // Хим.-фарм. журн. – 1989. – Т. 23, №4. – С. 486-491.
2. Банникова, Г. А. Определение тропикамида в крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором / Г. А. Банникова, А. Б. Мелентьев, А. В. Лаврентьева // Проблемы экспертизы в медицине. – 2011. – №1-2. – С. 16-18.
3. Барам, Г. И. Высокоэффективная жидкостная хроматография в контроле качества лекарственных средств / Г. И. Барам, Е. Д. Гольдберг, Д. В. Рейхарт, Р. У. Хабриев, В. А. Хазанов // Фарматека. – 2005. – №2. – С. 12-18.
4. Беликов, В.Г. Фармацевтическая химия. В 2 ч.: Учеб. пособие / В.Г. Беликов. – М: МЕДпресс-информ, 2007. – 624 с.
5. Большая российская энциклопедия лекарственных средств / Под ред. Ю.Л. Шевченко. – М.: Ремедиум, 2002. – 1000 с.
6. Бурчинский, С. Г. Принципы и средства фармакологической коррекции болевых спастических синдромов в неврологии / С. Г. Бурчинский // Клинический обзор. – Инст. геронтологии АМН Украины. Киев. – 2004. – С. 2-4.
7. Валидация аналитических методик для производителей лекарств / под ред. В. В. Береговых. – М.: Литтера, 2008. – 312 с.
8. Василюк, В. Б. Клиника, диагностика и лечение острых отравлений баклофеном / В. Б. Василюк, П. В. Кузнецов, А. Н. Гребенюк, Г. Л. Герасимов, В. М. Мануйлов, В. П. Бутиков, А. В. Багров // Военно-медиц. журнал, 2009. – Т. 330, №7. – С. 18-23
9. Веселовская, Н. В. Анализ опиатов в моче: руководство для химико-токсикологических и судебно-химических лабораторий / Н. В. Веселовская, Б. Н. Изотов. М.: ММА им. И.М.Сеченова, 2000. - 120 с.

10. Веселовская, Н. В. Наркотики. Свойства, действие, фармакокинетика, метаболизм / Н. В. Веселовская, А. Е. Коваленко. – М.: Триада-Х, 2000. – 204 с.
11. Веселовская, Н. В. Наркотики / Н. В. Веселовская, А. Е. Коваленко, И. П. Папазов. – М.: Нарконет, 2002. – 232 с.
12. Государственная фармакопея России 12-е изд., ч. 1 / М.: изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения». – 2007. – 704 с.
13. Гофман, А. Г. Клиническая наркология / А. Г. Гофман. – М.: Миклош, 2003. – 215 с.
14. Дегтерев, Е. В. Применение тонкослойной хроматографии в анализе сильнодействующих и наркотических веществ (обзор) / Е. В. Дегтерев, А. В. Гаевский, Е. А. Зенкова. // Хим.-фарм. журн. – 1998. – Т. 32, №8. – С. 48-54.
15. Дериватизация в ГХ/МС-анализе лекарственных и наркотических средств, имеющих токсикологическое значение: материалы к семинару судебно-медицинских экспертов. – М.: РЦСМЭ, Бюро судебно-медицинской экспертизы МЗ, 2002. – 86 с.
16. Еремин, С. К. Анализ наркотических средств / С. К. Еремин, Б. Н. Изотов, Н. В. Веселовская. – М.: Мысль, 1993. – 272 с.
17. Киреева, А. В. Химико-токсикологическое исследование буторфанола / А. В. Киреева, А. Б. Зеленцова, Н. В. Сайгушкин, А. А. Баталев, С. В. Волченко, В. Н. Куклин // Судебно-медиц. экспертиза. – 2008. – Т. 51, №2. – С. 23 – 26.
18. Киреева, А. В. Химико-токсикологическое исследование доксиламина / А. В. Киреева, А. Б. Вожева, С. М. Бахтина, С. В. Волченко, В. Н. Куклин // Судебно-медиц. экспертиза. – 2007. – Т. 50, №3. – С. 22 – 23.
19. Кобзарь, Я. В. Изолирование и обнаружение баклофена и мидокалма в трупном материале / Я. В. Кобзарь, В. А. Таран, В. С. Бубон. // Судебно-медиц. экспертиза. – 1989. – Т. 32, №4. – С. 48-49.

20. Коваленко, А. Е. Современные подходы к анализу наркотических веществ в биологических объектах / А. Е. Коваленко, Д. А. Кардонский, А. А. Еганов, Е. М. Саломатин // Судебно-медицинская экспертиза. – №2. – 2007. – С. 28-32.
21. Крамаренко, В.Ф. Токсикологическая химия / В.Ф. Крамаренко. – Киев: Выща школа, 1989. – 447 с.
22. Лагуткина, Т. П. Отравление лекарственными средствами, как индикатор социальной напряженности и социального неблагополучия / Т. П. Лагуткина, Н. П. Аксенова, Е. М. Саломатин // Судебно-медиц. экспертиза. – 2011. – № 4. – С. 23-26.
23. Лебедев, А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии / А. Т. Лебедев. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. – 493 с.
24. Лужников, Е. А. Клиническая токсикология / Е. А. Лужников. – М.: Медицина, 1999. – 368 с.
25. Машковский, М. Д. Лекарственные средства: пособие для врачей / М. Д. Машковский. – 15-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая волна, 2010. – 1216 с.
26. Мелентьев, А. Б. Влияние pH среды водной фазы на экстракцию веществ с различными кислотно-основными свойствами / А. Б. Мелентьев // Судебно-медиц. экспертиза. – 2003. – №2. – С. 40-43.
27. Мелентьев, А. Б. Практическое руководство по скринингу лекарственных, наркотических средств и их метаболитов методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором для целей судебной токсикологии / А. Б. Мелентьев. – Челябинск, 2001. – Ч.1. – 62 с.
28. Мелентьев, А. Б. Образование артефактов при подготовке проб и в процессе анализа при скрининге мочи методом ГХ/МС // Проблемы экспертизы в медицине. – 2008. – Т.8, №1. – С. 12-15.
29. Мелентьев, А. Б. Химико-токсикологических анализ органов и тканей с использованием метода пробоподготовки «Кэтчерс» / А. Б.

Мелентьев, Г. А. Латышева // Сборник тезисов конференции АСТЕ`2013. – М.: Издат. группа «Граница», 2013. – С. 20-22.

30. Моррисон, Р. Органическая химия / Р. Моррисон, Р. Бойд. – М.: Мир, 1974. – 1132 с.

31. Мюллер, Р. К. Токсикологический анализ / Р. К. Мюллер. – М.: Наука, 1995. – 562 с.

32. Назаров, В. А. Количественное определение баклофена в таблетках с помощью ионселективного электрода / В. А. Назаров, К. А. Андрончик, В. В. Егоров, С. А. Беляев, Т. Л. Юркштович // Хим.-фарм. журн. – Т. 45, №6. – 2011. – С. 50-52.

33. НД 42-294-02 Баклофен, таблетки 10, 25 мг. – «Polpharma». – Польша.

34. Новикова, Н. О. Клинические особенности острого отравления баклофеном / Н. О. Новикова // Актуальные вопросы современной медицины и фармации: материалы 60 итоговой науч.-практ. конф. студентов и мол. ученых / Под ред. А. П. Солодкова – Витебск: ВГМУ, 2008. – С. 390-394.

35. Общая токсикология / под ред. Б. А. Курляндского, В. А. Филова. – М.: Медицина, 2002. – 608 с.

36. Раменская, Г. В. ТСХ-скрининг токсикологически значимых соединений, изолируемых экстракцией и сорбцией: учеб. пособие / Г.В. Раменская / под ред. А. П. Арзамасцева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 240 с.

37. Рудаков, О. Б. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии / О. Б. Рудаков, И. А. Востров, С. В. Федоров, А. А. Филиппов, В. Ф. Селеменев, А. А. Приданцев. – Воронеж: Водолей, 2004. – 528 с.

38. Руководство ИСН «Валидация аналитических методик. Содержание и методология» Q2(R1) // Фармация. – 2008. – № 4. – С. 3-10.

39. Саватеев, А. М. Валидация методики анализа препарата «Асковертин» / А. М. Савватеев, В. Л. Белобородов, Н. А. Тюкавкина, В. П. Тихонов // Фармация. – 2004. – № 3. – С. 11-14.

40. Садек, П. Растворители для ВЭЖХ / П. Садек. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006. – 704 с.
41. Сакодынский, В. В. Аналитическая хроматография / В. В. Сакодынский, В. В. Бражников, С. А. Волков, Э. С. Ганкина, В. Д. Шатц. – М.: Химия, 1993. – 464 с.
42. Саломатин, Е. М. Усовершенствованная медицинская технология. Обнаружение морфина, кодеина и диацетилморфина (героина) при судебно-химическом исследовании трупной желчи / Е.М. Саломатин. – М.: РЦСМЭ, 2006. – 18с.
43. Справочник Видаля. Лекарственные препараты в России. – М.: АстраФармСервис, 2009. – 1760 с.
44. Сычев, С. Н. Методы совершенствования хроматографических систем и механизмы удерживания в ВЭЖХ: Монография. – Орел: ОрелГТУ, 2000. – 212с.
45. Тагиров, А. А. Острые преднамеренные отравления медикаментозным препаратом «Баклофен» у подростков / А. А. Тагиров, С. С. Ларионов // Успехи современ. естествознания. – 2014. – № 6 . – С. 94.
46. Терапевтические, токсические и летальные концентрации лекарственных и других химических веществ по данным Международной Ассоциации судебных токсикологов / Под ред. Uges D. R. – University Hospital Groningen, The Netherlands. – Т. 26, №1, дополнение. – 1996. – 16 с.
47. Токсикологическая химия. Аналитическая токсикология / под ред. Р. У. Хабриева, Н. И. Калетиной. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
48. Файзрахманова, И. М. Валидация методики анализа лаппаконитина – стандартного образца / И. М. Файзрахманова, Е. М. Цырлина, М. С. Юнусов и др. // Хим.-фарм. журн. – 2008. –Т. 42, №12. – С. 50-51.
49. Чернобровкин, М. Г. Определение аминокислот и их оптических изомеров в виде *о*-фталевых и дансильных производных методом ВЭЖХ: автореф. дис... канд. хим. наук / М. Г. Чернобровкин. – Москва, 2006. – 25 с.

50. Шаповалова, Е. Н. Прикладной химический анализ. Практическое руководство по хроматографическим методам анализа / Е. Н. Шаповалова, А. Д. Смоленков, М. В. Попик, О. А. Шпигун. – М.: МГУ, 2010. – 456 с.
51. Шатц, В. Д. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии / В. Д. Шатц, О. В. Сахартова. – Рига: Зинатне, 1988. – 390 с.
52. Швайкова, М. Д. Токсикологическая химия / М. Д. Швайкова. – М: Медицина, 1975. – 373 с.
53. Якубке, Х. Д. Аминокислоты, пептиды, белки / Х. Д. Якубке, Х. Ешкайт. – М.: Мир, 1985. – 456 с.
54. Ali, I. Optimization of the chiral resolution of baclofen by capillary electrophoresis using β -cyclodextrin as the chiral selector // I. Ali, H. Y. Aboul-Enein // Electrophoresis. – 2003. – № 24. – P. 2064-2069.
55. Baselt, R. C. Disposition of toxic drugs and chemicals in man / R. C. Baselt, R. H. Cravey. – 8th edition – Foster city, CA: Biomedical Publications, 2009. – 1720 p.
56. Borka, L. The formation, structure and analysis of the thermal decomposition product of baclofen / L. Borka // Acta Pharm Suec. – 1979. – Vol. 16, №5. – P. 345–348.
57. Bickeboeller-Friedrich, J. Screening for detection of new antidepressants, neuroleptics, hypnotics, and their metabolites in urine by GC-MS developed using rat liver microsomes / J. Bickeboeller-Friedrich, H. H. Maurer // Therapeutic Drug Monitoring. – 2001. – Vol. 23, №1. – P. 61-70.
58. British Pharmacopeia 1993. – London: HMSO. – 1995. – 300 p.
59. Chang, S. Y. Development and validation of a capillary electrophoresis method for the determination of baclofen in human plasma / S. Y. Chang, N.-Y. Zheng, C.-S. Chen // Intern. J. of Applied Science and Engineering. – 2004. – Vol. 2, №3. – P. 277-285.
60. Chang, S. Y. Determination of baclofen by derivatization with anthracene-2,3-dicarboxaldehyde followed by capillary electrophoresis with laser-

induced fluorescence detection / S. Y. Chang, H. Yang // *Chromatographia*. – 2003. – Vol. 57, №11. – P. 825-829.

61. Chiang, M. Chiral analysis of baclofen by α -cyclodextrin-modified capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection / M. Chiang, S. Y. Chang, C. Whang // *Electrophoresis*. – 2001. – Vol. 22, №1. – P. 123-127.

62. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. Fourth edition / Edited by A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop. – London: The Pharmaceutical Press, 2011. – 2480 p.

63. Cooke, D. E. Baclofen poisoning in children / D. E. Cooke, M. A. Glasstone // *Vet. Hum. Toxicol.* – 1994. – Vol. 36, №5. – P. 448-450.

64. Degen, P. H. The determination of gamma-amino-beta-(p-chlorophenyl)butyric acid (baclofen) in biological material by gas-liquid chromatography / P. H. Degen, W. Riess // *J. of chromatography*. – 1976. – Vol. 117, № 2. – P. 399-405

65. De Giovanni, N. Death due to baclofen and dipyrone ingestion / N. De Giovanni, E. d'Aloja // *Forensic Science International*. – 2001. – Vol. 1263, № 1. – P. 26 – 32.

66. Desidero, C. Enantiomeric separation of baclofen by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry with sulfobutylether- β -cyclodextrin as chiral selector in partial filling mode / C. Desidero, D.V. Rossetti, F. Perri, B. Giardina, I. Messana, M. Castagnola // *J. of chromatography B*. – 2008. – Vol. 875, №1. – P. 280-287

67. European Pharmacopoeia. 6th Edition, Supplement 6.1. – Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2007. – 310 p.

68. Ersoy, L. Fluorodensitometric determination of baclofen / L. Ersoy // *The Analyst*. – 1990. – Vol. 115, №12. – P. 1559-1560.

69. Ersoy, L. Determination of baclofen in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection / L. Ersoy, S. Tosunoglu // *The Analyst*. – 1995. – Vol. 120, №2. – P. 373-375.

70. Ersoy, L. A spectrophotometric method for the determination of baclofen / L. Ersoy // *Die Pharmazie*. – 1985. – Vol. 40, №11. – P. 803-804.
71. Ersoy, L. Fluorimetric determination of baclofen [gamma-amino-beta-(p-chlorophenyl)butyric acid] / L. Ersoy // *The Analyst*. – 1985. – Vol. 110, №7. – P. 881-882.
72. Faigle, J.W. The chemistry and kinetics of Lioresal / J.W. Faigle, H. Keberle // *Postgrad. Med. J.* – 1972. – Vol. 48, № 5. – P. 9-13
73. Flardh, M. Sensitive method for the determination of baclofen in plasma by means of solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry / M. Flardh, B. M. Jacobson // *J. of chromatography A*. – 1999. – Vol. 846, №1. – P. 169-173.
74. Fraser, A.D. Toxicological analysis of fatal baclofen (Lioresal) ingestion / A.D. Fraser, W. MacNeil, A.F. Isner // *J. Forensic Sci.* – 1991. – Vol. 36, №5. – P. 1596-1602.
75. Ghulam, A. S. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization / A. S. Ghulam // *J. of Chromatography A*. – 2003. – Vol. 987, №1-2. – P. 57–66.
76. Ghose, K. Complications of baclofen overdose / K. Ghose, K. M. Holmes, K. Matthewson // *Postgrad. Med. J.* – 1980. – Vol. 56, №662. – P. 865-867.
77. Goda, R. Simple and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of the S(+)- and R(–)-enantiomers of baclofen in human plasma and cerebrospinal fluid/ R. Goda, N. Murayama, Y. Fujimaki, K. Sudo// *J. of Chromatography B*. – 2004. – Vol. 801, №2. – P. 257-264.
78. Gu, Y.S. Capillary electrophoresis of baclofen with argon-ion laser-induced fluorescence detection / Y.S. Gu, C.W. Whang // *J. of Chromatography A*. – 2002. – Vol. 972, №2. – P. 289-293.

79. Harrison, P. M. Determination of 4-amino-3-(p-chlorophenyl)butyric acid (baclofen) in plasma by high-performance liquid chromatography / P. M. Harrison, A. M. Tonkin, A. J. McLean // J. of chromatography A. – 1985. – Vol. 339, №2. – P. 424-428.

80. Haubenstock, A. Baclofen intoxication: report of 4 cases and review of the literature / A. Haubenstock, K. Hruby, U. Jager, K. Lenz // J. Toxicol. Clin. Toxicol. – 1983. – Vol. 20, №1. – P. 59-68.

81. Hefnawy, M. M. Enantioselective high-performance liquid chromatographic method for the determination of baclofen in human plasma / M. M. Hefnawy, H. Y. Aboul-Enein // Talanta. – 2003. – Vol. 61, №5. – P. 667-673.

82. Hosseinimehr, S. J. Colorimetric determination of baclofen with ninhydrin reagent and compare with HPLC method in tablet / S. J. Hosseinimehr, F. Pourmorad, E. Moshtaghi, M. Amini // Asian J. of Chem. – 2010. – Vol. 22, №1. – P. 522-526.

83. Jeffrey, S. Baclofen aids in alcohol abstinence in cirrhosis patients / S. Jeffrey // Medscape. – 2007. – №370. – P. 1915-1922.

84. Joost, B. M. Stereoselective transport of baclofen across the blood-brain barrier in rats as determined by the unit impulse response methodology/ B. M. Joost, D. Corrie, A. de Boer, M. Danhof, D. Breimer // Pharmac. Research. – 1991. – Vol. 8, №2. – P. 259 – 262.

85. Kochak, G. Improved gas-liquid chromatographic method for the determination of baclofen in plasma and urine / G. Kochak, F. Honc // J. of chromatography A. – 1984. – Vol. 310, №2. – P. 319-326.

86. Kowalski, P. The bioequivalence study of baclofen and lioresal tablets using capillary electrophoresis / P. Kowalski, A. Chmielewska, L. Konieczna, I. Oledzka, P. K. Zarzycki, H. Lamparczyk // Biomedical chromatography. – 2004. – Vol. 18, №5. – P. 311-317.

87. Knutsson, E. Plasma and cerebrospinal fluid levels of baclofen(Lioresal) at optimal therapeutic responses in spastic paresis / E. Knutsson, U. Lindblom, A. Martensson // J. of Neurological Sciences. – 1974. – №23. – P. 473-484.

88. Krauss, D. Quantification of baclofen and its fluoro analogue in plasma and urine after fluorescent derivatisation with benoxaprofen chloride and thin-layer chromatographic separation / D. Krauss, H. Spahn, E. Mutschler // *Arzneimittel-Forschung*. – 1988. – Vol. 38, №10. – P. 1533-1536.

89. Lagarce, F. Biopharmaceutics of intrathecal baclofen-loaded microparticles in a goat model / F. Lagarce, N. Faisant, J.-C. Desfontis, L. Marescaux, F. Gautier, D. Holopherne, M.-C. Rousselet, P. Menei, Jean-Pierre Benoit // *Internat. J. of Pharmaceutics*. – 2005. – №298. – P. 68-79.

90. Lee, T. H. Baclofen intoxication: report of four cases and review of the literature / T. H. Lee, S. S. Chen, S. L. Su, S. S. Yang // *Clin. Neuropharm.* – 1992. – №15. – P. 56-62.

91. Leung, N. Y. Baclofen overdose: defining the spectrum of toxicity / N. Y. Leung, I. M. Whyte, G. K. Isbister // *Emerg. Med. Australas.* – 2006. – №18. – P. 77-82.

92. Lipscomb, D. J. Baclofen overdose / D. J. Lipscomb, T. J. Meredith // *Postgrad. Med. J.* – 1980. – Vol. 56, №652. – P. 108-109.

93. Maurer, H. H. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology / H. H. Maurer // *J. of chromatography B.* – 1998. – Vol. 713, №1. – P. 3-25.

94. Maurer, H. H. Systematic toxicology analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry / H. H. Maurer // *J. of chromatography A.* – 1992. – Vol. 580, №1-2. – P. 3-41.

95. Miksa, I. Direct and rapid determination of baclofen (Lioresal) and carisoprodol (Soma) in bovine serum by liquid chromatography-mass spectrometry / I. Miksa, P. Rudik, H. Robert // *J. of analyt. toxicology*. – 2003. – Vol. 27, №4. – P. 275-283.

96. Millerioux, L. High-performance liquid chromatographic determination of baclofen in human plasma / L. Millerioux, M. Brault, V. Gualano // *J. of chromatography A.* – 1996. – Vol. 729, №4. – P. 309-314.

97. Mohamed, M. Enantioselective high-performance liquid chromatographic method for the determination of baclofen in human plasma / M. Mohamed, Y. Hassan // *Talanta*. – 2003. – Vol. 61, №7. – P. 667 – 673.
98. Munzar, P. Failure of baclofen to modulate discriminative-stimulus effects of cocaine or methamphetamine in rats / P. Munzar, S.W. Kutkat, C.R. Miller, S.R. Goldberg // *European J. of Pharmacol.* – 2000. – Vol. 408, №2. – P. 169-174.
99. Ostermann, M. E. Coma mimicking brain death following baclofen overdose / M. E. Ostermann, B. Young, W. J. Sibbald, M. W. Nicolle // *Intensive Care Medicine*. – 2000. – Vol. 26, №8. – P. 1144-1146.
100. Otles, S. Handbook of food analysis instruments / S. Otles, – New York: CRC Press, 2009. – 508 p.
101. Perry, H. E. Baclofen overdose: Drug experimentation in a group of adolescents / H. E. Perry, R. O. Wright, M. W. Shannon, A. D. Woolf // *Pediatrics* – 1998. – Vol. 101, №6. – P. 1045-1048.
102. Regenthal, R. Drug levels: therapeutic and toxic serum/plasma concentrations of common drugs / R. Regenthal, M. Krueger, C. Koepfel, R. Preiss // *J. Clin. Monit. Comput.* – 1999. – № 15. – P. 529–544.
103. Reis, G. M. Baclofen, an agonist at peripheral GABAB receptors, induces antinociception via activation of TEA-sensitive potassium channels / G. M. Reis, I. D. Duarte // *British J. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 149, №6. – P. 733-739.
104. Repetto, M. R. Concentrations in human fluids: 101 drugs affecting the digestive system and metabolism / M. R. Repetto, Repetto M. // *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* – 1999. – №37. – P. 1-8.
105. Roberge, R. J. Supraventricular tachyarrhythmia associated with baclofen overdose / R. J. Roberge, T. G. Martin, M. Hodgman, J. G. Benitez, J. E. Brunswick // *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* – 1994. – №32. – P. 291-297.
106. Rustum, A. M. Simple and rapid reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of baclofen in human plasma with ultraviolet

detection. Application to a pharmacokinetic study / A. M. Rustum // J. of chromatography A. – 1989. – Vol. 487, №1 – P. 107-115.

107. Sallerin-cauteab, B. A sensitive method for the determination of baclofen in human CSF by high performance liquid chromatography / B. Sallerin-cauteab, B. Monsarrat, Y. Lazorthesc, J. Crosa, R. Bastideb. // J. of Liquid Chromatography. – 1988. – №11. – P. 1753-1761.

108. Shimada, K. Separation of the diastereomers of baclofen by high performance liquid chromatography using cyclodextrin as a mobile phase additive / K. Shimada, K. Mitamura, M. Morita, K. Hirakata // J. of Liquid Chromatography. – 1993. – Vol. 16, №15. – P. 3311-3320.

109. Shirley, K. W. Intrathecal baclofen overdose and withdrawal / K. W. Shirley, S. Kothare, J. H. Jr. Piatt, T. A. Adirim // Pediatr. Emerg. Care. – 2006. – Vol. 22, № 4. – P. 258-261.

110. Sioufi, A. Determination of the S(+)- and R(-)-enantiomers of baclofen in plasma and urine by gas chromatography using a chiral fused-silica capillary column and an electron-capture detector / A. Sioufi, G. Kaiser, F. Leroux, J. P. Dubois // J. of Chromatography A. – 1988. – Vol. 450, №2. – P. 221-232.

111. Spahn, H. Enantiospecific high-performance liquid chromatographic (HPLC) determination of baclofen and its fluoro analogue in biological material / H. Spahn, D. Kraub, E. Mutschler // Pharmac. Research. – 1988. – Vol. 37, №2. – P.181-184.

112. Stefan van Staden, R. I. Enantioselective, potentiometric membrane electrodes based on cyclodextrins: Application for the determination of R-baclofen in its pharmaceutical formulation // R. I. Stefan van Staden, A. A. Rat'ko // Talanta. – 2006. – Vol. 69, №5. – P. 1049-1053.

113. Stefan-van Staden, R.I. Determination of baclofen enantiomers in pharmaceutical formulations using maltodextrin-based enantioselective, potentiometric membrane electrodes. / R.I. Stefan-van Staden, A.A. Rat'ko // Il Farmaco. – 2004. – Vol. 59, №12. – P. 993-997.

114. Sullivan, R. Baclofen overdose mimicking brain death / R. Sullivan, M. J. Hodgman, L. Kao, L. M. Tormoehlen // Clin. Toxicol (Phila). – 2012. – Vol. 50, №2. – P. 141-144.
115. Suntornsuk, L. Simultaneous determination of R-(-), S-(+)-baclofen and impurity A by electrokinetic chromatography / L. Suntornsuk, S. Ployngam // J. of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2010. – Vol. 51, №3. – P. 541-548.
116. Swahn, C. G. Mass fragmentographic determination of 4-amino-3-p-chlorophenylbutyric acid (baclofen) in cerebrospinal fluid and serum / C. G. Swahn, H. Beving, G. Sedvall // J. of chromatography A – 1979. – Vol. 162, № 3 – P. 433-438.
117. Toyo'oka, T. Resolution of chiral drugs by liquid chromatography based upon diastereomer formation with chiral derivatization / T. Toyo'oka // J. of Biochem. and Biophys. Methods. – 2002. – Vol. 54, №1-3. – P. 25-56.
118. United States Pharmacopoeia 28. National Formulary23. – Rockville: United States Pharmacopoeial convention, Inc., 2005. – 3187 p.
119. Vaccher, C. Preparative resolution of saclofen and hydroxysaclofen wit analytical-scale high-performance liquid chromatography / C. Vaccher, P. Berthelot, N. Flouquet, M. Vaccher, M. Debaert // J. of chromatography A. – 1996. – Vol. 732, № 11. – P. 239-243.
120. Vaccher, M. P. Chiral capillary electrophoretic resolution of baclofen, gabaergic ligand, using highly sulfated cyclodextrins / M. P. Vaccher, E. Lipka, J. P. Bonte, C. Vaccher // Electrophoresis. – 2004. – Vol. 25, №7-8. – P. 1111-1119.
121. Vaccher, M. P. Enantiomeric analysis of baclofen analogs by capillary zone electrophoresis, using highly sulfated cyclodextrins: Inclusion ionization constant pKa determination / M. P. Vaccher, E. Lipka, J. P. Bonte, C. Foulon, J. F. Goossens, C. Vaccher // Electrophoresis. – 2005. – Vol. 26, №15. – P. 2974-2983.
122. Van Dierendonk, D. R. Baclofen and ethanol ingestion: a case report - drug experimentation in a group of adolescents / D. R. van Dierendonk, D. J. Dire // J. of Emergency Medicine. – 1999. – Vol. 17, №6. – P. 989-993.

123. Veredas, V. Continuous chromatographic separation of a baclofen precursor (N-Boc-4-[p-chloro-phenyl]-2-pyrrolidone) in a simulated moving bed using a polysaccharide carbamate as chiral stationary phase / V. Veredas, M. J. S. Carpes, C. R. D. Correia, C. C. Santana / J. of Chromatography A. – 2006. – Vol. 1119, №1-2. – P. 156-162.
124. Wall, G. M. Determination of baclofen and alpha-baclofen in rat liver homogenate and human urine using solid-phase extraction, o-phthalaldehyde-tert.-butyl thiol derivatization and high-performance liquid chromatography with amperometric detection / G. M. Wall, J K. Baker // J. of Chromatography. – 1989. – Vol. 491. – P. 151-162.
125. Weatherby, R. P. Resolution of the stereoisomers of baclofen by high performance liquid chromatography / R. P. Weatherby, R. D. Allan, G. A. Johnston // J. Neurosci. Meth. – 1984. – №10. – P. 23-28.
126. Wiersma, H. E. Pharmacokinetics of a single oral dose of baclofen in pediatric patients with gastroesophageal reflux disease / H. E. Wiersma, C. J. van Boxtel, J. J. Butter, W. M. C. van Aalderen, T. Omari, M. A. Benninga // Ther. Drug Monit. – 2003. – Vol. 25, №1. – P. 93-98.
127. Wuis, E. W. Enantioselective high-performance liquid chromatographic determination of baclofen after derivatization with a chiral adduct of o-phthaldialdehyde / E. W. Wuis, E. W. Beneken Kolmer, L. E. van Beijsterveldt, R. C. Burgers, T. B. Vree, E. van der Kleyn // J. of Chromatography. – 1987. – Vol. 415, №2. – P. 419-422.
128. Wuis, E. W. High-performance liquid chromatographic analysis of baclofen in plasma and urine of man after precolumn extraction and derivatization with o-phthaldialdehyde / E. W. Wuis, R. J. M. Dirks, T. B. Vree, E. van der Kleyn // J. of Chromatography B. – 1985. – Vol. 337. – P. 341-350.
129. Wuis, E. W. Pharmacokinetics of baclofen in spastic patients receiving multiple oral doses / E. W. Wuis, R. J. M. Dirks, T. B. Vree, E. van der Kleyn // Pharm. Weekbl. Sci. – 1990. – Vol. 12, №2. – P. 71-74.

130. Wuis, E. W. Plasma and urinary excretion kinetics of oral baclofen in healthy subjects / E. W. Wuis, R. J. M. Dirks, E. F. S. Termond, T. B. Vree, E. Kleijn // *European J. of Clin. Pharmacol.* – 1989. – Vol. 37, №2. – P. 181–184.
131. Wuis, E. W. Rapid simultaneous determination of baclofen and its gamma-hydroxy metabolite in urine by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection / E. W. Wuis, L. E. van Beijsterveldt, R. J. M. Dirks, T. B. Vree, E. Kleyn // *J. of Chromatography.* – 1987. – Vol. 420, №1. – P. 212-216.
132. Winek, C. L. Winek's drug and chemical blood-level data 2001 / C. L. Winek, W. W. Wahba, C. L. Jr. Winek, T. W. Balzer // *Forensic Sci. Int.* – 2001. – Vol. 122, №2-3. – P.107-23.
133. Zhy, Z. Chiral separation and determination of R-(–) - and S-(+)-baclofen in human plasma by high-performance liquid chromatography / Z. Zhy, L. Neirinck // *J. of Chromatography B.* – 2008. – Vol. 785, № 2. – P.277-283.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

ОБ ОПРЕДЕЛЕНИИ БАКЛОФЕНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

Проект информационного письма

Информационное письмо предназначено для судебных экспертов-химиков бюро судебно-медицинской экспертизы, врачей-лаборантов химико-токсикологических лабораторий

Баклофен – 4-амино-3-(4-хлорфенил)-бутановая кислота, лекарственный препарат, относящийся к группе веществ, влияющих на нервно-мышечную передачу (синонимы – Лиорезал, Баклосан, Спастин и др.) Основное проявление фармакологической активности баклофена – антиспастическое действие. Он оказывает также миорелаксирующее и анальгезирующее действие на организм, угнетает моно- и полисинаптические рефлексы в спинном мозге, уменьшает тонус мышц.

Физико-химические свойства баклофена

Баклофен представляет собой порошок белого цвета. Мало растворим в воде, очень мало растворим в 96% этаноле, практически не растворяется в ацетоне, диэтиловом эфире и в хлороформе. В связи с наличием в структуре карбоксильной и аминогрупп, баклофен проявляет кислотные и основные свойства ($pK_1=3,9$; $pK_2=9,6$). Растворяется в разбавленных минеральных кислотах и в разбавленных щелочах.

Баклофен по структуре является аминокислотой, поэтому может вступать в реакцию этерификации с образованием сложного эфира.

При нагревании (117-118 °C) слабокислого раствора баклофена возможно взаимодействие амино- и карбоксильной групп внутри одной молекулы, с образованием лактама 4-(4-хлорфенил)-пирролидин-2-она.

Кислотный раствор баклофена имеет три полосы поглощения в УФ области:

$\lambda_{\text{макс}} = 259, 266 \text{ и } 274 \text{ нм}$

Фармакодинамика и фармакокинетика баклофена

Баклофен – миорелаксант центрального действия, который отличается от других антиспастических средств, как по механизму действия, так и по фармакологическим свойствам.

Применяют баклофен для уменьшения спастичности при рассеянном склерозе, при поражениях (травмы, опухоли) спинного мозга, инсульте головного мозга, церебральном параличе, воспалении мозговых оболочек, травмах головы и др. Имеются данные о применении баклофена для лечения эффективного расстройства при алкоголизме. В основе вызываемой баклофеном миорелаксации лежит воздействие преимущественно на спинальном уровне и связано с угнетением моно- и полисинаптических рефлексов, а также со снижением активности γ -мотонейронов.

Баклофен быстро и полностью всасывается из желудочно-кишечного тракта. После однократного приема внутрь 20 мг баклофена, пиковая концентрация в плазме уже через 2,5 ч составляет 0.27 мкг/мл, а терапевтическая концентрация баклофена в плазме крови – 0.2-0.6 мкг/мл. Максимальная концентрация баклофена в плазме крови (0.5-0.6 мкг/мл) достигается через 2-3 ч после приема, затем концентрация баклофена в плазме снижается и сохраняется на уровне 0.2 мкг/мл в течение 8 ч.

Баклофен на 30% связывается с белками плазмы, а период полувыведения его составляет в среднем 3-4 ч. Около 15% принятой дозы метаболизируется в печени путем дезаминирования. Выводится баклофен, главным образом, в неизмененном виде: через 24 ч около 80% препарата выводится через почки, 15% – в виде метаболитов, а оставшая часть – с фекалиями. Около 15% введенной дозы выводится в виде основного метаболита – β -(4-хлорфенил)- γ -гидроксимасляной кислоты, – который фармакологически неактивен. После приема внутрь препарат полностью выводится из организма в течение 72 ч

Основным проявлением передозировки является угнетение ЦНС. Усиливаются побочные эффекты, появляется спутанность сознания,

нарушение походки, галлюцинации, судороги, тошнота, рвота, сухость во рту, отвращение к пище; в отдельных случаях – кома, угнетение дыхания. В литературе описаны случаи острых отравлений при передозировке баклофена. При этом концентрация баклофена достигает в сыворотке крови 1,1-3,5 мг/л (токсическая концентрация). Лечение заключается в промывании желудка, гемодилюции, форсированном диурезе, симптоматической терапии. Специфического антидота не существует. Клиническая картина отравления баклофеном неспецифична, симптомы отравления могут быть схожи с таковыми при отравлении синтетическими наркотиками, алкоголем, антидепрессантами, барбитуратами и другими веществами, действующими на центральную нервную систему.

В результате передозировки баклофена может наступить смерть. В этом случае концентрация баклофена в сыворотке крови может достигать 17 мг/л, а в моче – 760 мг/л.

Методики исследования биологических объектов на наличие баклофена

1. Скрининг мочи и внутренних органов на наличие баклофена

Пробоподготовка мочи: к 1 мл мочи добавляли по каплям 1 мл концентрированной хлороводородной кислоты (до pH 2.0), флаконы закрывали резиновыми пробками и фиксировали металлическими фиксаторами. Далее флаконы помещали в кипящую водяную баню и выдерживали 30 мин. После охлаждения жидкости до комнатной температуры прибавляли 3-4 капли трихлоруксусной кислоты и дважды экстрагировали по 2 мл гексана для удаления неполярных липофильных веществ. Затем водный слой отделяли и нейтрализовали гидрокарбонатом натрия до pH 6.5-7.0. Далее прибавляли 1-2 капли 25%-го раствора аммиака до pH 8.5-9.0 и дважды экстрагировали по 2 мл смеси бутанол - хлороформ (1:9) по 10 мин. Полученные органические экстракты отделяли, объединяли и выпаривали досуха во флаконе в токе теплого воздуха.

Пробоподготовка внутренних органов: 5 г исследуемой печени или стенки желудка гомогенизировали, помещали в полипропиленовую пробирку для экстракции объемом 50 мл из набора VetexQ Tox, прибавляли 50 мкл раствора этилморфина с концентрацией 0.1 мг/мл (внутренний стандарт) и 5 мл ацетонитрила, перемешивали и встряхивали в течение 1 мин, затем добавляли 0.1 мл конц. HCl. Полученную смесь обрабатывали на ультразвуковой бане 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. Смесь встряхивали в течение 5 мин и центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин. Надосадочный слой выпаривали в токе теплого воздуха.

К сухим остаткам прибавляли по 200 мкл смеси уксусный ангидрид – пиридин (3:2), выдерживали в термостате в течение 30 мин при 70 °C. После окончания реакции ацетилирования жидкость выпаривали в токе теплого воздуха, сухие остатки растворяли в 0.5 мл этилацетата и исследовали методом ГХ/МС.

Условия ГХ/МС анализа: газовый хроматограф Agilent Technologies 6890N (США) с автосамплером Agilent Technologies 7683B и квадрупольным масс-спектрометром Agilent Technologies 5973 Network в качестве детектора, кварцевая капиллярная колонка HP-5MS (сополимер 5%-дифенил-95%-диметилсилоксана) 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 °C, экспозиция при начальной температуре 1 мин, далее нагрев до температуры 200 °C со скоростью 40 °C/мин и до температуры 300 °C со скоростью 12.5 °C/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 °C. Ввод пробы осуществляли с помощью автосамплера в режиме без деления потока

(Splitless); объем пробы – 1 мкл. Ионизация электронным ударом (70 эВ). Время задержки растворителя 3.5 мин.

ГХ/МС анализ исследуемых растворов проводили в режиме сканирования (SCAN) в диапазоне масс от 40 до 600 а.е.м. Идентификацию масс-спектров проводили с использованием библиотечных данных MPWTOX7 и Wiley7.

При использовании методик скрининга мочи и внутренних органов на наличие лекарственных и наркотических веществ методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором обнаружение баклофена происходит в виде 4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона и N-ацетил-4-(4-хлорфенил)-2-пирролидинона с временами удерживания 7.26 мин и 7.43 мин соответственно.

Данные методики подходят для обнаружения и качественного определения баклофена в моче и внутренних органах, при этом количественное определение не представляется возможным, так как из одного соединения образуется два артефакта с переменным их соотношением.

2. Исследование мочи на наличие баклофена

Пробоподготовка образцов мочи: к 1 мл мочи прибавляют 1 мл ацетонитрила, выдерживали в ультразвуковой ванне 15 мин при температуре 40 °С и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. 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 и 1 мл гексана, 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.

Пробоподготовку образцов мочи для построения градуировочного графика проводили следующим образом: по 1 мл мочи, предварительно проверенной на отсутствие лекарственных веществ, помещали в стеклянные флаконы объемом 15 мл, прибавляли по 2, 5, 7, 10, 12 и 15 мкл исходного раствора баклофена в 0.1 М хлороводородной кислоте с концентрацией 10 мг/мл, перемешивали, далее проводили пробоподготовку аналогично исследуемым образцам.

Условия ВЭЖХ-анализа: жидкостной хроматограф Agilent Technologies 1200 (США) с многоволновым диодно-матричным детектором, колонка Phenomenex Luna 5u C18(2) 100 A, 250×4.6 мм, 5 мкм; предколонка Eclipse XDB-C18 4-Pack 4.6x12.5 мм, 5 мкм. Температура термостата колонки 30 °С. Подвижная фаза (ПФ): ацетонитрил – 10мМ триэтиламина, градиентное элюирование, состав подвижной фазы изменялся от 0 до 20% ацетонитрила.

Время удерживания баклофена на хроматограмме составило 7.53 мин. Спектр в области вершины пика приведен на рис. 1.

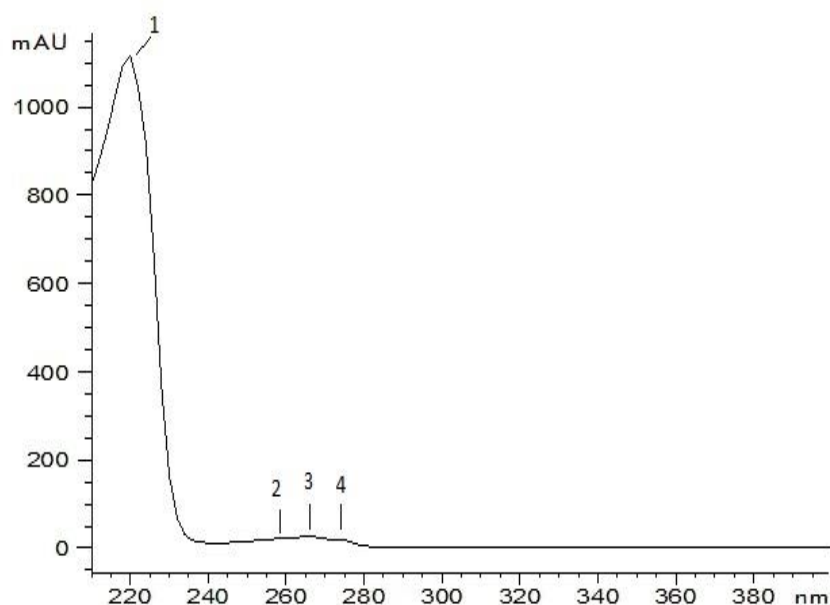


Рисунок 1 – УФ-спектр баклофена, полученный в ходе ВЭЖХ-анализа с использованием диодноматричного детектора (максимумы поглощения, нм: 1 – 220; 2 – 259; 3 – 266; 4 – 274)

Сочетание времени удерживания пика баклофена при приведенных условиях анализа и УФ-спектра позволяет с достаточной селективностью идентифицировать данное соединений.

Расчет концентрации проводили по градуировочному графику (рис. 2).

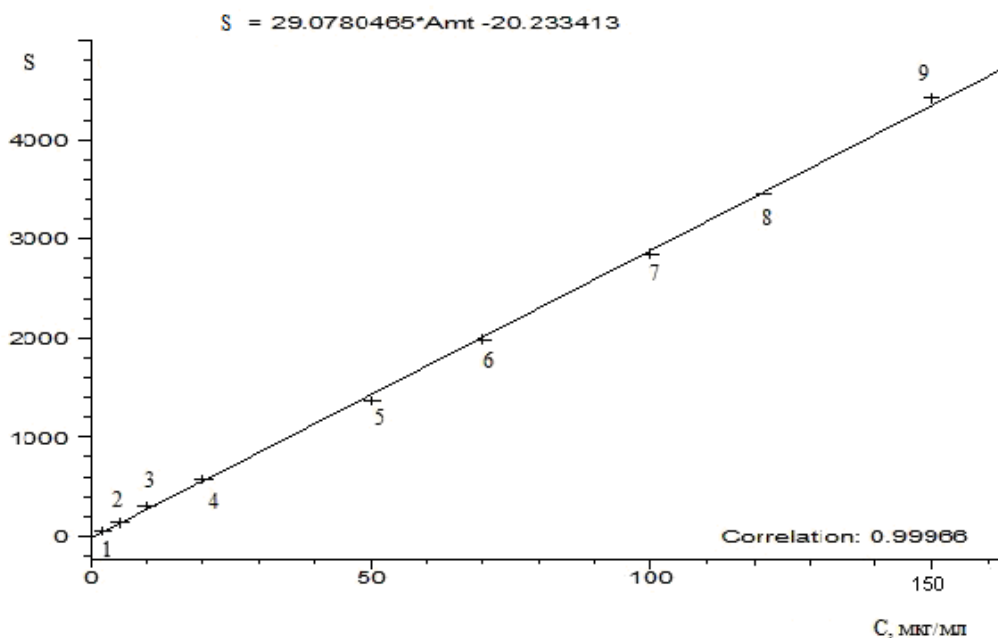


Рисунок 2 – Градуировочный график для определения концентрации баклофена в моче методом ВЭЖХ/УФ

3. Исследование крови на наличие баклофена

Пробоподготовка образцов крови: к 1 мл крови прибавляли 50 мкл водного раствора внутреннего стандарта фенибута (концентрация 1 мкг/мл, РУП «БЕЛМЕДПРЕПАРАТЫ»), 2-3 капли 50%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, выдерживали на шейкере 15 мин, затем центрифугировали в течение 15 мин при скорости 4000 об/мин. 20 мкл надосадочного слоя переносили в вials и добавляли 980 мкл дистиллированной воды.

Для построения градуировочного графика использовали трупную кровь, предварительно проверенную на отсутствие лекарственных веществ. Пробоподготовку образцов крови для построения градуировочного графика

проводили следующим образом: по 1 мл крови помещали в стеклянные флаконы объемом 15 мл, прибавляли по 5, 10, 25, 50, 75, 100 мкл водного раствора баклофена (Sigma, США) с концентрацией 10 мкг/мл, перемешивали, далее проводили пробоподготовку аналогично исследуемым образцам. Для получения более высоких концентраций баклофена в крови (1500, 2000, 2500, 3000 и 4000 нг/мл) использовали водный раствор баклофена с концентрацией 100 мкг/мл.

Условия ВЭЖХ-МС/МС анализа: жидкостной хроматограф UltiMate 3000 (Dionex, Германия) с масс-спектрометрическим детектором – тройной квадруполь с линейной ионной ловушкой QTRAP 5500 (AB SCIEX, Канада), хроматографическая колонка Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 мкм, 150 × 4,6 мм), температура термостата колонки 37 °С, ПФ ацетонитрил – метанол – 0.65 mM водный раствор ацетата аммония (15:15:70), изократический режим, скорость потока элюента 1 мл/мин. Объем вводимой пробы 20 мкл, ввод пробы осуществляли с помощью автосамплера. После каждого анализа колонка промывалась чистым ацетонитрилом в течение 5 мин. Масс-спектрометр работал в режиме регистрации положительных ионов, ионизация электроспреем. Условия работы источника ионов: температура источника ионов 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), с помощью которой были подобраны параметры MRM переходов (табл. 1).

Идентификацию пика баклофена проводили по времени удерживания заданных пар ионов (родительский ион – дочерний ион). При параметрах анализа, приведенных выше, время удерживания баклофена составило 3.59 мин, а фенибута – 2.95 мин. Определение концентрации баклофена проводили по наиболее интенсивному отклику пары ионов с m/z 214 → 151, отношение к площади пика внутреннего стандарта проводили по наиболее интенсивному отклику пары ионов фенибута с m/z 180 → 163.

Градуировочный график для определения концентрации баклофена в крови приведен на рис. 3.

Таблица 1 – Параметры MRM переходов баклофена и фенибута

Вещество	MRM переход	DP, В	CE, эВ	CXP, В
баклофен	214 → 151	60	25	12
	214 → 179	60	28	12
	214 → 197	60	14	12
фенибут (внутренний стандарт)	180 → 163	60	13	13
	180 → 145	60	17	13
	180 → 117	60	27	13

где MRM – мониторинг множественных реакций (multiple reaction monitoring mode), DP – потенциал декластеризации (declustering potential), CE – энергия соударений (collision energy), CXP – напряжение на выходе ячейки соударений (collision cell exit potential)

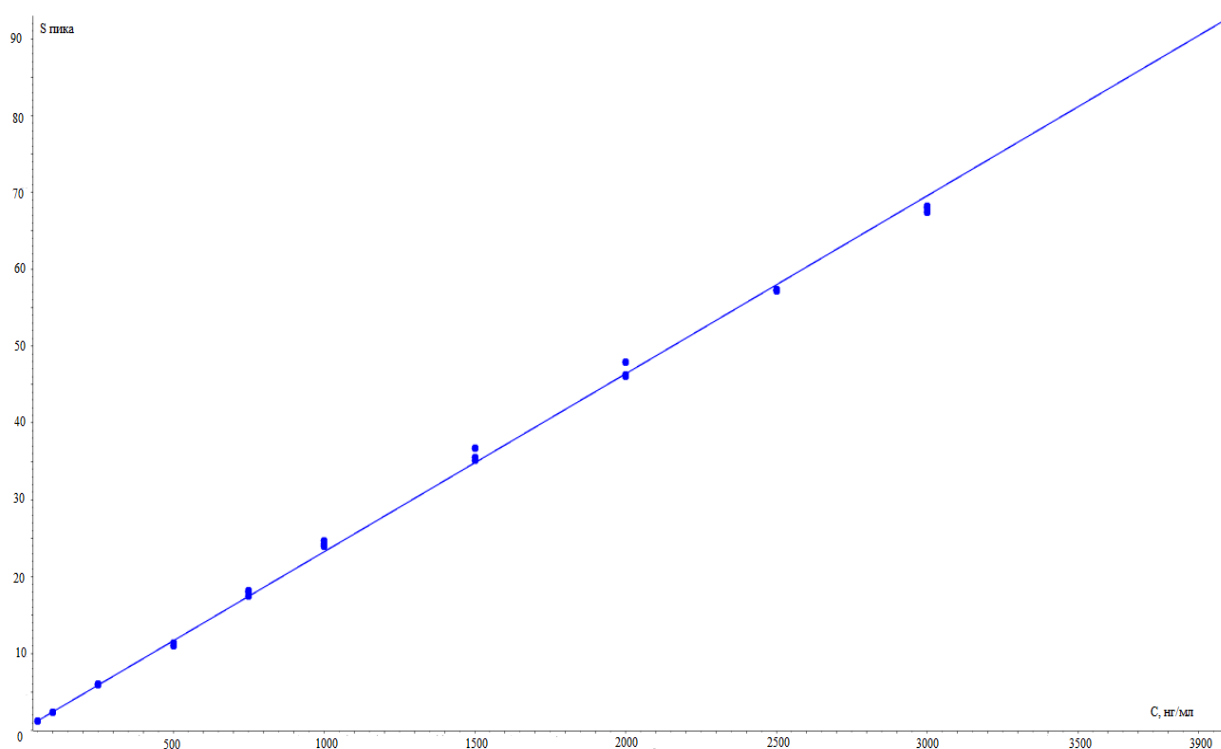


Рисунок 3 – Градуировочный график для определения концентрации баклофена в крови методом ВЭЖХ-МС/МС

Описанные методики количественного определения баклофена в крови и моче валидированы по показателям специфичность, линейность, правильность, повторяемость, предел количественного определения.

Общая схема исследования биологических объектов при ненаправленном анализе на наличие баклофена приведена на рис. 4.

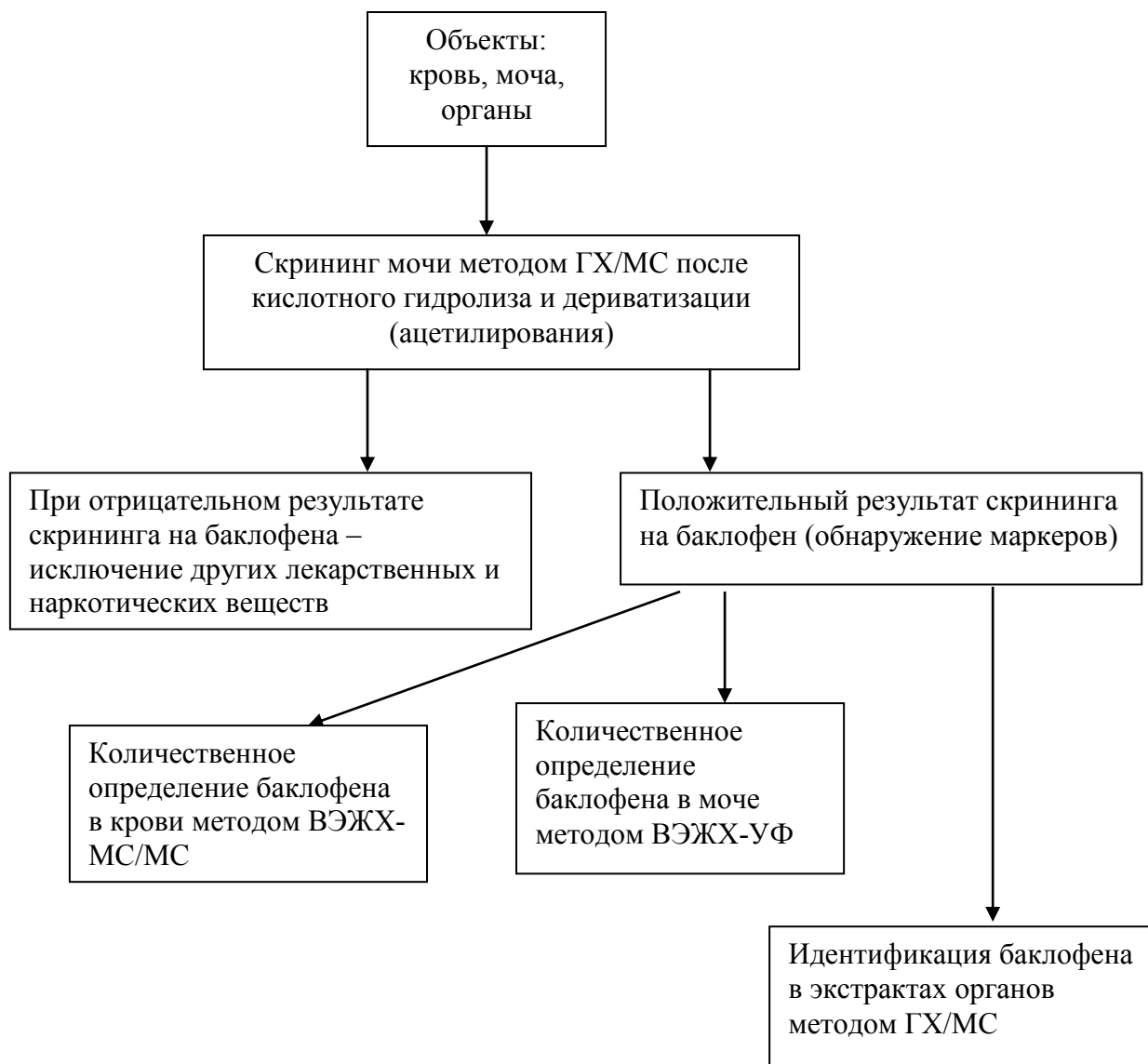


Рисунок 4 – Общая схема исследования биологических объектов при ненаправленном анализе на наличие баклофена

Приложение 2

Краевое государственное бюджетное
учреждение здравоохранения

"Красноярское краевое бюро
судебно-медицинской экспертизы"

(КГБУЗ ККБСМЭ)

пр. Мира, д. 35, г. Красноярск, 660049

Тел.: (391) 227-17-39

Факс: (391) 227-25-71

E-mail: sme@krm.krk.ru, krsk@sudmed.info

http: www.sme.krk.ru

ОКПО/ОГРН 21890699/1032402947378

ИНН/КПП 2466064557/246601001

от 27 АВГ 2015 № _____

на № _____

г _____ г

УТВЕРЖДАЮ

Начальник КГБУЗ «ККБСМЭ»

_____ А.В. Донской

« _____ » _____ 2015 г.

АКТ

о внедрении в практику работы судебно-химического отделения КГБУЗ
«Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы» результатов
научно-исследовательской работы

Результаты диссертационной работы Дуковой О. А. «Идентификация и
количественное определение баклофена в биологических объектах
хроматографическими и тандемными методами» внедрены в практику судебно-
химического отделения КГБУЗ «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской
экспертизы» с 1.01.2015 г. Разработанные в диссертации методики идентификации и
количественного определения баклофена в биологических объектах, а также схема
судебно-химического исследования при ненаправленном анализе на наличие
баклофена используются в судебно-химическом отделении при выполнении
судебно-химических экспертиз и исследований.

зав. судебно-химическим

отделением, к.х.н.



Г. А. Слащинин

Приложение 3

«Утверждаю»

Начальник ГБУЗ Бюро СМЭ
Оренбургской области

В.К. Филиппов

«18» сентября 2015г

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование: «Идентификация и количественное определение баклофена в биологических объектах хроматографическими и тандемными методами».

Теоретические и практические результаты, их новизна: предложены оптимальные схемы судебно-химического исследования при отравлениях баклофеном и оптимизированы методики его изолирования из биологических тканей и жидкостей. Обоснованы и разработаны методики обнаружения и количественного определения баклофена.

Апробация и внедрение методик проведено в судебно-химическом отделении ГБУЗ Бюро судебно-медицинской экспертизы Оренбургской области.

Предложение внесено по результатам научно-исследовательской работы, выполненной в Федеральном государственном образовательном автономном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет» и в Государственном бюджетном образовательном учреждении ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ Дуковой Ольгой Александровной

Методики отличаются высокой чувствительностью, дают хорошо воспроизводимые результаты, статистически достоверны.

Заключение: методики признаны пригодными для судебно-химического исследования биологических объектов на наличие баклофена. Разработанный комплекс методик обнаружения и количественного определения на основе современных физико-химических методов исследования (ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ) с использованием аналитического оборудования, имеющегося в нашем отделении, позволил выработать оптимальную схему анализа и дал возможность достоверно установить факт приема баклофена или отравления им.

Зав. Судебно-химическим отделением

Бюро судебно-медицинской экспертизы г. Оренбурга: О.Н. Баландина

Подпись О.Н. Баландиной удостоверяю: Ф.Н. Нурғалимова Начальник отдела кадров

Приложение 4

Утверждаю:

Начальник ГБУЗ «Челябинское
областное бюро судебно-
медицинской экспертизы»,

к.м.н. Швед Е.Ф.



«15» июня 2015

А К Т

внедрения в практику работы ГБУЗ «Челябинское областное бюро судебно-медицинской экспертизы» результатов диссертационной работы Дуковой О.А.

«Идентификация и количественное определение баклофена в биологических объектах хроматографическими и тандемными методами».

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе председателя — заведующего СХО Мелентьева А.Б., и членов — врача судебно-медицинского эксперта Латышевой Г.А. и химика-эксперта Банниковой Г.А. удостоверяем, что результаты диссертационной работы Дуковой О.А. «Идентификация и количественное определение баклофена в биологических объектах хроматографическими и тандемными методами» внедрены в практику судебно-химического отделения ГБУЗ «Челябинское областное бюро судебно-медицинской экспертизы» с 10.01.2015 г.

1. Разработанная в диссертационной работе схема судебно-химического и химико-токсикологического исследования при отравлении баклофеном с идентификацией баклофена методом ГХ-МС используется в СХО для выполнения судебно-химических исследований и экспертиз.

2. Приведенные в диссертационной работе данные по извлечению баклофена из биологических сред и пределам его обнаружения различными методами позволили выработать оптимальную схему анализа с использованием оборудования, имеющегося в

нашем отделении.

3. Комиссия отмечает актуальность представленных в диссертационной работе методик и целесообразность использования этих разработок в экспертной практике судебно-химического отделения Челябинского бюро судебно-медицинской экспертизы.

Председатель:

Заведующий СХО, к.х.н.



А.Б. Мелентьев

Члены комиссии:

Врач судебно-медицинский эксперт



Г.А. Латышева

Химик-эксперт



Г.А. Банникова

Подписи Мелентьева А.Б., Латышевой Г.А. и Банниковой Г.А. удостоверяю:

Начальник отдела кадров



Е.А.Калмыкова

«15» 06 2015 г.

Государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего профессионального образования
**«Красноярский государственный
медицинский университет
имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
ГБОУ ВПО КрасГМУ
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого
Минздрава России**
Партизана Железняк ул., д. 1, г. Красноярск, 660022
тел. 220-13-95 факс (391) 228-08-60, e-mail: rector@krasgmu.ru
ОКПО: 01962882 ОГРН: 1022402471992
ОКТМО: 04701000
ИНН/КПП: 2465015109/246501001

Г
Г «УТВЕРЖДАЮ» Г

Ректор ГБОУ ВПО КрасГМУ
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого
Минздрава России
д.м.н., профессор

И.П. Артюхов

2015 г.



№ _____
На № _____ от _____
Г _____ Г _____

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

Наименование предложения для внедрения: результаты по разработке методик качественного обнаружения и количественного определения лекарственного препарата «Баклофен» в биологических жидкостях человека хроматографическими и тандемными методами для химико-токсикологического и судебно-химического исследований с целью диагностики острого отравления баклофеном по темам «Хроматография» и «Спектрофотометрия».

Источник информации: результаты диссертационной работы Дуковой О.А. по теме «Идентификация и количественное определение баклофена в биологических объектах хроматографическими и тандемными методами».

Где и когда внедрено: ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава РФ, кафедра биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, начало внедрения – май 2014 г.

Форма внедрения: Чтение лекций и проведение практических занятий со студентами 4, 5 курсов очной и заочной формы обучения фармацевтического факультета.

Эффективность внедрения: повышение уровня подготовки специалистов фармацевтического профиля по использованию современных методов анализа в химико-токсикологических и судебно-химических исследованиях.

Замечания и предложения: рекомендуется внедрение в учебный процесс как обучающих методик по качественному обнаружению и количественному определению баклофена в биологических жидкостях человека (крови, моче).

**Заведующий кафедрой биохимии
с курсами медицинской, фармацевтической
и токсикологической химии,
доктор медицинских наук, профессор**

А. Б. Салмина