

На правах рукописи

Данилюк Александра Александровна

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛАБИЛЬНЫХ АНАЛИТОВ И ПРОДУКТОВ ИХ
МЕТАБОЛИЗМА МЕТОДАМИ ГХ-МС И ВЭЖХ**

02.00.02 – аналитическая химия

Автореферат

5 ДЕК 2013

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук



Воронеж - 2013

Работа выполнена в ФГОУ ВПО «Воронежский государственный
архитектурно-строительный университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, доцент
Рудакова Людмила Васильевна

Официальные оппоненты: **Нифталиев Сабухи Илч-оглы**, доктор
химических наук, профессор, ФГОУ ВПО
"Воронежский государственный университет
инженерных технологий",
заведующий кафедрой
неорганической химии и химической
технологии

Голубицкий Григорий Борисович, доктор
химических наук, ОАО "Фармстандарт -
Лексредства", г. Курск, начальник отдела новых
технологий

Ведущая организация: **ФГБУН «Институт физической химии и
электрохимии имени А. Н. Фрумкина РАН»
г. Москва**

Защита состоится «18» декабря 2013 г. в 16.00 на заседании
Диссертационного совета Д 212.038.19 при Воронежском государственном
университете, расположенном по адресу: 394006, г. Воронеж, Университетская
пл., 1, ауд.439.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке
Воронежского государственного университета.

Автореферат разослан « 15 » ноября 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Столповская Н.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Расширение возможностей применения метода газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) для скринингового определения как можно более широкого класса соединений, имеющих токсикологическое, наркологическое и судебно-химическое значение крайне актуально. Острота проблемы связана с непрерывным увеличением числа такого рода аналитов, которые зачастую являются лабильными веществами, что приводит к возникновению ряда трудностей в процессах пробоподготовки и газохроматографического определения. Иногда о наличии в пробе искомого вещества можно судить только по продуктам их превращений.

Удешевление оборудования ГХ-МС за счет усовершенствования аппаратуры и массового производства приборов привело к значительному распространению данного метода. Несмотря на то, что в настоящее время в результате выполнения ряда федеральных целевых программ в стране существует значительный парк хромато-масс-спектрометров, их полноценное применение затруднено в связи с отсутствием соответствующего методического обеспечения. Поэтому разработка унифицированных способов определения большого количества подконтрольных соединений (скрининг), включающая формирование масс-спектральных библиотек удерживания для распространенных хроматографических фаз является необходимой и насущной задачей настоящего времени.

Сравнительная простота и надежность идентификации соединений с помощью ГХ-МС делает выгодным применение данного метода даже в случае невозможности определения самих нативных соединений, вследствие их термолабильности или биотрансформации в организме человека. Значительная часть данной работы посвящена вопросам модификации исходных форм, позволяющей дальнейшее их определение методом ГХ, а также вопросам деградации определяемых соединений в процессах хранения, метаболизма и пробоподготовки. Определение продуктов подобных процессов позволяет сделать вывод о природе исходных соединений.

Цель исследования – разработка усовершенствованных методик хромато-масс-спектрометрического обнаружения лабильных аналитов.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- Выявление корреляционных зависимостей индексов удерживания на среднеполярной фазе по сравнению со слабополярными (фенил)мелилсилоксановыми фазами.
- Разработка способов выделения подконтрольных нативных соединений и продуктов их деградации и биотрансформации методами жидкостной (ЖЖЭ) и твердофазной (ТФЭ) экстракции из биообъектов.
- Разработка методик количественного определения биологически активных соединений с использованием методов ГХ-МС и ВЭЖХ.
- Идентификация продуктов деградации ряда соединений и их метаболитов методами ГХ-МС, ВЭЖХ, УФ- и ИК-спектроскопии, а также направленным синтезом.

Научная новизна работы.

Установлена корреляционная зависимость между индексами удерживания для 420 соединений на фазах, аналогичных 5% и 50% фенилметилполисилоксан (EVDX-5ms и DB-17ms)

Идентифицированы ранее не известные производные, метаболиты, продукты окисления и дериваты, образуемые инсектицидом бенсультапом и лекарственными препаратами дротаверином и кветиапином (всего 30 соединений), определены их хроматографические, УФ- и масс-спектральные характеристики. Исследован процесс термолита производных кветиапина в условиях ГХ.

Измерены коэффициенты распределения для 5 соединений в системе хлороформ-вода в зависимости от pH водной фазы, и найдены условия для проведения ЖЖЭ.

Показаны пути оптимизации пробоподготовки в условиях ТФЭ и измерены эффективность экстракции для 12 соединений из перечисленных групп.

Практическая значимость. Создана библиотека индексов удерживания 420 соединений, имеющих токсикологическое, наркологическое и судебно-химическое значение для фаз EVDX-5ms и DB-17ms

Разработаны способы количественного определения в биообъектах (кровь, внутренние органы) банкочла, нерестиоксина, дротаверина, кветиапина и продуктов их окисления методом ВЭЖХ. Разработаны способы идентификации нерестиоксина, дротаверина, кветиапина и продуктов их дегградации и биотрансформации методом ГХ-МС, включающие стадию пробоподготовки, основанную на ЖЖЭ или ТФЭ.

Положения, выносимые на защиту:

- Существует нелинейная корреляционная зависимость между индексами удерживания на среднеполярной и слабополярных фазах для летучих соединений.
- Усовершенствованы условия ТФЭ, в которых аналит переводится для концентрирования в ту или иную молекулярную или ионную форму.
- Результаты идентификации лабильных аналитов в биообъектах по результатам скринингового ГХ-МС и вспомогательных методов (ВЭЖХ, УФ и ИК-спектроскопии).
- Способы количественного определения бенсультапа, дротаверина и кветиапина методами ГХ-МС и ВЭЖХ.

Апробация работы. Основные положения и результаты работы доложены на конференциях: IV съезд ВМСО (Москва, 2009); III Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, 2009); VII Всероссийская конференция по анализу объектов окружающей среды "Экоаналитика-2009" (Йошкар-Ола, 2009 г.); Всероссийская конференция "Теория и практика хроматографии. Хроматография и нанотехнологии" (Самара, 2009 г.); II Международный симпозиум по сорбции и экстракции (Владивосток 2009).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 4 статей в периодических изданиях, рекомендованных ВАК РФ для опубликования научных трудов, 8 тезисов и материалов докладов на международных и всероссийских конференциях и симпозиумах.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, 6 глав, списка цитируемой литературы из 150 источников. Материал работы изложен на 126 страницах, содержит 33 рисунка, 7 таблиц, приложение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **Главе 1** (Методы хроматографического определения лабильных соединений в биологических объектах) представлен критический обзор публикаций по вопросам хроматографического определения соединений, подлежащих контролю в биологических объектах. Были рассмотрены сферы применения, достоинства и ограничения методов ГХ и ВЭЖХ. Нестабильность ряда соединений в условиях определения или их биотрансформации накладывает ограничения на выбор методов определения и пробоподготовки. Видоизменения исходных соединений (метаболизм, окисление и гидролиз) приводит к необходимости идентификации получающихся продуктов и – в ряде случаев – к необходимости косвенных количественных определений. Несмотря на преобладание ВЭЖХ в анализе биоматериалов на наличие нестабильных токсикантов, следует заключить, что создание методик, ориентированных на применение метода ГХ-МС в обзорных режимах позволяет снизить трудоемкость и увеличить экспрессность и надежность определения. Обзор способов пробоподготовки показал приоритет метода ТФЭ при определении соединений в сложных матрицах. В главе дана также краткая характеристика изучаемых аналитов, рассмотрены вопросы необходимости коррекции используемых методов для их выделения и определения.

Во второй главе описаны объекты исследования и методики эксперимента.

Основная часть исследования выполнена на приборах: газовые хроматографы 6890 (Agilent Technologies), оснащенные азотно-фосфорным, пламенно-ионизационным и масс-селективным квадрупольным детектором 5375VL; жидкостной модульный хроматограф 1200 (Agilent Technologies) с бинарным насосом G1312A и диодно-матричным детектором (ДМД) G1315B. Колонки: слабополярная EVDX-5ms, среднеполярная DB-17ms (ГХ) и SB-C18 (ВЭЖХ). ИК-спектры регистрировали на спектрометре FTS Scimitar 2000 (Digilab) в таблетке бромида калия. УФ-спектры измеряли на спектрофотометре 8453 (Agilent Technologies). Величину pH растворов проб и элюентов измеряли с помощью pH метра Эксперт-001 (Эконикс-эксперт). Для ТФЭ применяли два вида патронов: обращенно-фазовые AccuBOND II ODS-C18 (200мг×3 мл) и смешанные AccuBond II EVIDEX (200мг×3 мл).

Для подтверждения идентификации ряда соединений использовали метод встречного синтеза (кислотный и основной гидролиз, окисление). Модификацию определяемых соединений проводили ацетилированием (АС) или триметилсилилированием (TMS).

Для обработки масс-хроматограмм использовали программный пакет AMDIS (NIST), выполняющий деконволюцию масс-хроматограмм и идентификацию целевых соединений. Масс-спектры расшифровывали с помощью программы «MS Interpreter 2.0» (NIST). Идентификацию известных соединений осуществляли, используя базу данных ГХ-МС NIST08.

В главе 3 рассмотрены вопросы использования колонки со среднеполярной фазой (50% фенилметилполисилоксана) для подтверждения идентификации соединений и их метаболитов в скрининговом режиме ГХ-МС. Проведен корреляционный расчет индексов удерживания.

В методе ГХ-МС применяют для идентификации параметр удерживания и масс-спектр компонента. Эти параметры не могут быть вычислены с допустимой погрешностью на основании только общих физико-химических характеристик идентифицируемого соединения; библиотеки удерживания на среднеполярных фазах малораспространены. Тем не менее, при использовании линейного индекса как параметра удерживания можно определять корреляционные зависимости между индексами, измеренными для неполярных фаз (I_{NP}) и используемой среднеполярной фазой (I_{MP}). В качестве источника данных для этих зависимостей взяли многочисленные опубликованные значения I_{NP} (для метилполисилоксана) или (что более предпочтительно), индексы для распространенных слабополярных фаз (5% фенилдиметилполисилоксан, I_{LP}). Последние были взяты из внутрилабораторных библиотек, что улучшило корреляцию. Следует отметить, что в этом случае появляется дополнительный идентификационный показатель – разница $I_{MP} - I_{LP}$, характеризующая полярность соединения.

В процессе экспертных исследований биообразцов мы измерили величины $I_{MP,EXP}$ более 420 соединений, имеющих наркологаическое, токсикологическое и судебно-химическое значение и определили корреляцию между этими величинами и значениями I_{NP} (опубликованными) и I_{LP} (измеренными нами). Для расчета неизвестных значений $I_{MP,CALC}$ предложено использовать линейную зависимость:

$$I_{MP,CALC}(T_{MP}) = a + b * I_{LP}(T_{LP}), \quad (1)$$

где T_{MP} , T_{LP} отражают температурные режимы работы колонок.

Дискриминацию значений, применяемых в расчете (1) осуществляли по следующему алгоритму. Если относительная погрешность расчета равна

$$\Delta I, \% = 100 * \frac{I_{MP,EXP} - I_{MP,CALC}}{I_{MP,EXP}}, \quad (2)$$

тогда значения $\Delta I, \%$ расположенные в порядке возрастания для всего использованного массива данных образуют S-образную кривую, Рис. 1.

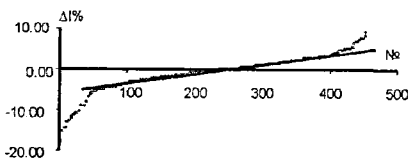


Рис. 1. Отклонения $\Delta I, \%$ для всех рассматриваемых соединений, расположенные в порядке возрастания

Значения $I_{MP,EXP}$ и $I_{LP,EXP}$, соответствующие находящимся на линейном участке этой кривой значениям $\Delta I, \%$ использованы для расчета параметров уравнения (1). Поскольку крайние значения $\Delta I, \%$ равны $\pm 4\%$, то все соединения, характеризующиеся большими отклонениями расчета, дискриминированы. Данная зависимость позволяет выбрать группу соединений, для которых допустим расчет индексов по уравнению (1). Число соединений, вошедших в данную группу,

составляет 70% от общего количества случайно отобранных соединений, коэффициент корреляции для аппроксимации по уравнению (1) равен 0.994. Большие отрицательные ошибки характерны для слабополярных соединений, индексы которых почти не меняются при смене фаз; большие положительные ошибки – для высокополярных соединений. На Рис. 2 приведены значения абсолютной разницы индексов удерживания ($\Delta I = I_{MP,EXP} - I_{LP,EXP}$) группы отобранных соединений в зависимости от удерживания ($I_{LP,EXP}$) на слабополярной фазе; линейная зависимость соответствует расчетным значениям согласно уравнению (1).

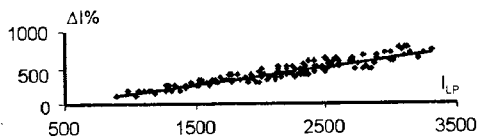
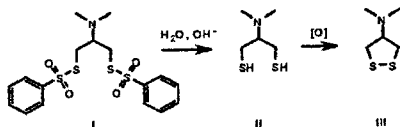


Рис. 2. Зависимость величин ΔI группы отобранных среднеполярных соединений от их индексов для слабополярной фазы.

Полученная зависимость использована для оценки индексов удерживания исследуемых соединений для среднеполярной фазы DB-17ms, а также для подтверждения правильности идентификации их структур.

В Главе 4 (Определение неренестокина, его производных и метаболитов) рассмотрены возможности ТФЭ и ГХ-МС в определении бенсультапа (*S,S'*-[2-(диметиламино)-1,3-пропандил] дибензолтиосульфат) (I), который является распространенным средством борьбы с колорадским жуком. Для него характерна легкая гидролизуемость в водной среде в присутствии оснований до дигидронеренестокина (II), быстро окисляющегося до непосредственно действующего компонента неренестокина (4-диметиламино-1,3-дителиолан) (III) уже в присутствии кислорода воздуха.



Скорость гидролиза бенсультапа была изучена в модельных растворах (50 об. % ацетонитрила в фосфатном буфере) измеряли методом ВЭЖХ, (рис. 3).

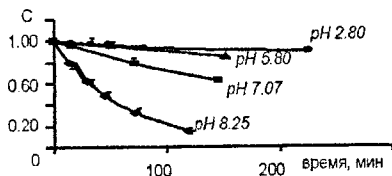


Рис. 3. Зависимость убывания концентрации бенсультапа от pH

В свою очередь, образующийся нерейстоксин подвергается дальнейшему окислению. Из смеси продуктов окисления нами были выделены два основных соединения, которые идентифицированы как сульфоксид (в виде смеси диастереомеров IV, IV') и сульфон V.

Метаболизм нерейстоксина идет тремя путями: S-метилирование, окисление и N-деметилирование, проходящие через стадию образования дигидронерейстоксина (II). В образцах мочи обнаружили и идентифицировали три соединения (VII, VIII, VIII'), причем VIII, VIII' образуют диастереомерную пару. Соединения IX, X идентифицировали после ацетилирования.

Все сказанное указывает на нецелесообразность прямого определения бенсультапа в биобразцах. Исключением могут быть лишь среды с заведомо высоким (и возможно, мало изменяющимся) его содержанием: например, содержимое желудка или промывные воды. Также это соединение отличается термолабильностью, что делает возможность его определения методом ГХ весьма сомнительной. Поэтому предложен метод обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием кислого (pH 3) элюента для предотвращения гидролиза. На рис. 4 приведена хроматограмма торгового образца бенсультапа и его УФ-спектр в элюенте.

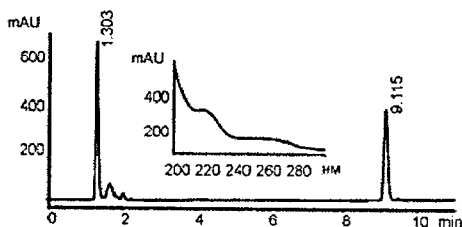


Рис. 4. ВЭЖХ-хроматограмма торгового образца бенсультапа.

Состав подвижной фазы – линейный градиент от 50 до 90 об.% ацетонитрила в фосфатном буфере 10 мМ. Детектирование при 205 нм, запись спектра 200-500 нм. Калибровочный график линеен, по крайней мере, в диапазоне 0.3-300 мкг/мл. Порог обнаружения составляет около 0.05 мкг/мл, относительное среднеквадратичное отклонение (СКО, %) результатов измерения 0.8%.

Производные нерейстоксина (бенсультапа) могут быть определены методом ГХ с масс-селективным или термононным детектированием. Поскольку специфика судебно-химического анализа предполагает необходимость проведения подтверждающих определений, мы разработали варианты определения производных бенсультапа с использованием двух фаз разной полярности. В табл. 1. приведены индексы удерживания рассмотренных соединений.

Пороги обнаружения нерейстоксина близки как для масс-спектрометрического детектора (в режиме регистрации общего ионного тока), так и для азотно-фосфорного детектора и примерно равны 0.1 мкг/мл.

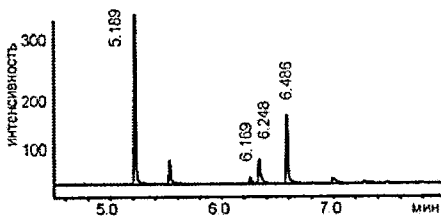
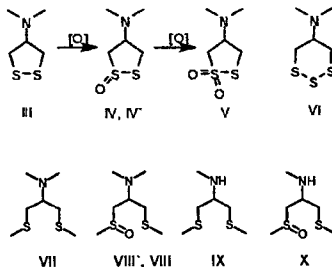


Рис. 5. ГХ-МС- хроматограмма компонентов, выделенных из образца мочи методом ТФЭ, регистрация общего ионного тока. (Времена удерживания: **III** – 5.19, **IV** – 6.17, **IV'** – 6.25, **V** – 6.49 мин)

Таблица 1. Индексы удерживания производных и метаболитов нерейстоксина на двух колонках

Соединение	M	EVDX-5ms I_{1F}	DB-17ms I_{2F}	$I_{2S} - I_{1S}$
III (нерейстоксин)	149	1309	1527	218
IV'	165	1551	1892	341
IV	165	1580	1927	347
V	181	1637	2028	391
VI (тиоциклам)	181	1554	1803	249
VII	179	1396	1602	206
VIII'	195	1696	2064	368
VIII	195	1696	2067	371
IX	165	1341	1544	203
X	181	1633	1996	363



Соединения **IV**, **IV'**, **V**, **VII**, **VIII**, **VIII'**, **IX**, **X** не представлены в базе NIST08.

Разнообразие свойств производных бенсультапа не позволяет выработать единый способ очистки проб методом ТФЭ. Поэтому предложено три варианта экстракции в зависимости от вида аналитической задачи. В табл. 2 приведены условия проведения ТФЭ для трех групп соединений.

Таблица 2. Условия ТФЭ определяемых соединений

Соединение	Выход (%)	Патрон (механизм)	Состав	
			кондиционирование и загрузка	элюирование
I	96	АссиBOND II ODS-C18 (гидрофобный)	30 об. % ацетонитрила в фосфатном буфере 50 мМ, pH 5	этилацетат
III IV V	88 74 86	АссиBOND II ODS-C18 (гидрофобный, различие удерживания молекулярной и ионной форм)	водный раствор K_2HPO_4 , 100 мМ, pH=8.3	фосфатный буфер, 100 мМ pH 2
VII VIII IX-X	52 5 10-20	АссиBOND II EVIDEX (катионообменный)	водный раствор ортофосфорной кислоты pH 2	дихлорметан:изопропанол:водный раствор аммиака, (78:20:2)

Из-за нестабильности бенсультапа в основной среде использование ионнообменного механизма для его выделения не целесообразно, поскольку предполагает элюирование основными растворами. Но растворимость бенсультапа в воде крайне низка, поэтому для его загрузки использовали водные растворы, содержащие 30 об. % ацетонитрила.

Показано, что соединения **III-V** являются катионами при $pH \leq 3$ и растворимы в воде. Однако для их выделения ионообменный способ неприменим, поскольку он приводит к относительно высоким выходам только при низкой ионной силе загрузаемого раствора. При переходе к реальным образцам (моча, экстракты

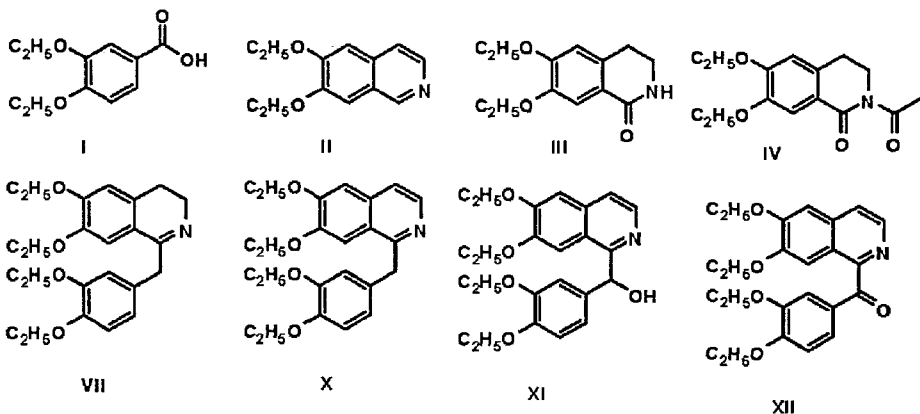
биологических тканей) выход анализов резко снижался (~15%), что, скорее всего, обусловлено малыми константами обмена. Эти соединения могут быть экстрагированы с применением гидрофобного механизма, но подобный подход неизбежно расширяет круг создаваемых соединений, а, следовательно, значительно снижает чистоту экстрактов. Поэтому предложено воспользоваться различием гидрофобного удерживания ионных и молекулярных форм **III-V** (что было показано методом ВЭЖХ). Действительно, такой подход не является стандартным способом использования обращенно-фазовых патронов. Но различие в удерживании форм (30-50 раз) делает его вполне применимым. Метаболиты (**VII**, **VIII** и исходные формы **IX-X**) плохо удерживаются на обращенно-фазовых патронах что, скорее всего, является следствием высоких значений pK_a данных соединений. Поэтому для их выделения использовали методику, предназначенную для определения основных соединений.

Глава 5. (Определение дротаверина и продуктов его окисления в скрининговом анализе). Дротаверин (но-шпа, 1-(3,4-диэтоксibenзилден)-6,7-диэтокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин гидрохлорид) - синтетический аналог папаверина, широко распространенное в фармакологической практике соединение, обладающее миотропным спазмолитическим действием.

Несмотря на то, что физико-химические характеристики дротаверина делают его удобным объектом для определения методом ВЭЖХ-ДМД, мы полагаем необходимым включение этого соединения в общий список компонентов, определяемых скрининговым методом ГХ-МС. В пользу подобного подхода свидетельствует легкая окисляемость дротаверина, приводящая к образованию ряда продуктов его окислительной дегградации в биообразцах, надежная идентификация которых возможна только с помощью масс-селективных детекторов. Поэтому, несмотря на то, что нам неизвестны работы по исследованию ГХ-поведения дротаверина, основное внимание уделено именно этому варианту определения, а также идентификации продуктов окисления.

Окисление дротаверина может протекать (последовательно или параллельно) как с участием мостиковой метиленовой группы, соединяющей циклические фрагменты, так и с участием метиленовых групп, принадлежащих к изохинолиновому циклу.

В первом случае образуется этаверин **X** - спазмолитик, входящий в ряд фармацевтических композиций. Этаверин - постоянный спутник дротаверина, характеризующийся меньшей окисляемостью, хорошо заметный как в режиме ГХ, так и ВЭЖХ. Соединение **XII** весьма стабильно и (подобно этаверину) также почти всегда присутствует в дротаверин-содержащих смесях; соединение **XI** напротив, весьма неустойчиво. Дальнейшая дегградация приводит к разделению бензильного и изохинолинового фрагментов и образованию (в частности) диэтоксильных производных бензойной кислоты (**I**, ДЭБК), изохинолина (**II**, ДЭИХ) и дигидроизохинолинона (**III**, ДГИХ). Соединение **Ia** (этилат ДЭБК) образуется при пробоподготовке образцов, содержащих дегградированный дротаверин в присутствии этанола. Соединение **Ib** (триметилсилильное производное ДЭБК) можно наблюдать при силилировании подобных образцов, ацетат **4** - при их ацетилировании.



Соединения V, VI являются дезэтилированными метаболитами дротаверина; соединения VIII, IX могут являться как продуктами метаболизма (дезэтилирование), так и окисления. Мы не определяли положений дезэтилированных групп; можно лишь сказать, что этих положений как минимум, два. Индексы удерживания рассмотренных соединений приведены в табл. 3. Соединения Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, XI, XII отсутствуют в базе NIST08.

Таблица 3. Индексы удерживания производных и метаболитов дротаверина на двух колонках разной полярности.

Соединение	M	EVDX-5ms	DB-7ms	$I_{2F} I_{1F}$
		I_{1F}	I_{2F}	
Ia	238	1754	2056	302
Ib	282	1792	—	—
II	217	1971	2327	356
III	235	2271	2819	548
IV	277	2306	2767	461
V	369	2878	3482	604
VI	369	2892	3503	611
VII (дротаверин)	397	2917	3518	601
VIII	367	2951	3582	631
IX	367	2978	3622	644
X (этаверин)	395	3010	3644	634
XI	411	3203	3903	700
XII	409	3299	4034	735

Для количественного определения дротаверина использовали метод внутреннего стандарта (гексадецила додеканонат). В режиме SCAN для широкого диапазона концентраций (2-950 мкг/мл) калибровочный график хорошо описывается квадратичной зависимостью (квадрат коэффициента корреляции $R^2 = 0.9999$), порог обнаружения 470 нг/мл. В режиме SIM по трем ионам (область малых концентраций, 0.1 – 2 нг/мл) калибровочный график практически линейен, $R^2 = 0.9999$, порог обнаружения 9 нг/мл. СКО определения относительной площади пика

дротаверина составляет 2.2%. Хроматограмма производных дротаверина, выделенных из мочи, приведена на рис.6.

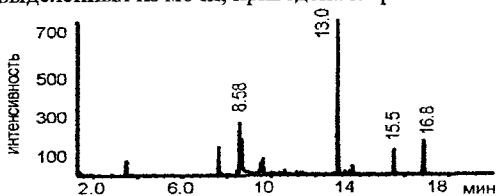


Рис. 6. ГХ-МС-хроматограмма, извлечения из мочи (детектирование по общему ионному току). Колонка DB-17ms. Времена удерживания (мин) компонентов: 8.58 (II), 13.0 (VII), 15.5 (XI), 16.8 (XII).

Для малоокисленных образцов усовершенствовали ВЭЖХ-ДМД методику определения дротаверина и ряда его производных. Величина pK_a дротаверина (измеренная методом ВЭЖХ в элюентах состава 40 об. % ацетонитрила в фосфатном буфере при 25°C) примерно равна 4.6. Учитывая легкую окисляемость дротаверина (преимущественно в форме основания), а также зависимость состояния хромофора от pH , должны использоваться сильноокислые элюенты. С другой стороны, при снижении pH элюента ниже 2, ухудшается разделение компонентов VII, X, XII. Поэтому предложено применение элюентов с pH 2.2-2.5. Но эта величина должна уточняться при использовании определенной колонки. Предложено два варианта хроматографирования - градиентный и изократический режимы.

При объеме ввода 10 мкл и детектировании при $\lambda=202$ нм калибровочный график практически линейен ($R^2=0,9998$) в диапазоне концентраций 0,02 – 100 мкг/мл. Порог обнаружения 2 нг/мл. СКО определения площади пика дротаверина (абсолютная калибровка) составляет 0.8%.

Для выделения дротаверина использовали ЖЭКЭ и ТФЭ. В условиях ЖЭКЭ дротаверин экстрагируется из водных растворов в хлороформ в широком (1—9) диапазоне pH с высокими коэффициентами распределения (>9). Тем не менее, при экстракции дротаверина из кислых растворов (что обусловлено меньшей окисляемостью) невозможно получать чистые экстракты вследствие соэкстракции ряда соединений матрицы. Поэтому предлагается метод ТФЭ с использованием патрона AccuBond II EVIDEX. В данном случае отличительной особенностью проведения ТФЭ является отсутствие стадии сушки, и добавление к элюату 0.1 мл уксусной кислоты. Эффективность ТФЭ проверяли методом ВЭЖХ. При экстракции из водных модельных растворов для двух патронов средний выход составил 93.0 % (расхождение 4 %) из мочи 94,8 % (расхождение 3 %).

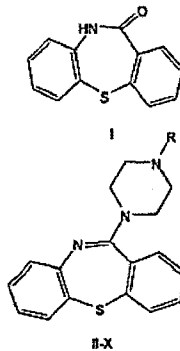
Глава 6. (Особенности выбора метода определения кветиапина в биообъектах). Кветиапин (quetiapine, сероквель, seroquel, 2-[2-(4-дibenзо[b,f][1,4]гиазепин-1-ил-1-пиперазинил)этокси]-этанол) – атипичный нейролептик, сравнительно новое антипсихотическое средство, применяемое для лечения острых антипсихотических состояний, и, в частности – для лечения психозов. Фармакологической особенностью кветиапина является его почти полная (~99%) биотрансформация. В этом случае аналитику следует сосредоточиться на определении одного из метаболитов. С другой стороны, прием кветиапина в токсических дозах может привести к снижению степени

биотрансформации и, следовательно, к формированию его значительных концентраций в биообъектах.

Методом ГХ-МС мы идентифицировали ряд метаболитов и производных кветиапина и определили их удерживание, табл. 4.

Таблица 4. Индексы удерживания производных и метаболитов кветиапина на двух колонках

Соединение	M	EVDX-5ms	DB-17ms	$I_{2,F} - I_{1,F}$
		$I_{1,F}$	$I_{2,F}$	
I	227	2354	2911	557
II	295	2744	3392	648
III	339	3070	3796	726
IV	323	3110	3925	815
V	411	3095	—	—
VI	367	3136	3833	697
VII	337	3172	3964	792
VIII	381	3173	3879	706
IX (кветиапин)	383	3347	4120	773
X	455	3389	—	—
XI	425	3461	4231	770



где R = -H (II), - (CH₂)₂-OH (III), -CHO (IV), - (CH₂)₂-O-TMS (V), - (CH₂)₂-O-C₂H₅ (VI), - Ac (VII), - (CH₂)₂-O-Ac (VIII), - (CH₂)₂-O-(CH₂)₂-OH (IX, кветиапин), - (CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-TMS (X), - (CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-Ac (XI). Соединения I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XI не представлены в базе NIST08. Согласно нашим измерениям, в смеси метаболитов (наблюдаемых данным методом) преобладает соединение II.

Рассмотрение хроматографических процессов и анализ масс-спектров окрестностей хроматографических зон кветиапина, его производных и дериватов привело к выводу о низкой термостабильности подобных соединений. На это указывает, в первую очередь, несовпадение селективных масс-хроматограмм, рис. 7. Ион с m/z 210 соответствует производным кветиапина (m/z 210, C₁₃H₈NS⁺), 207 – вероятным продуктам термоллиза.

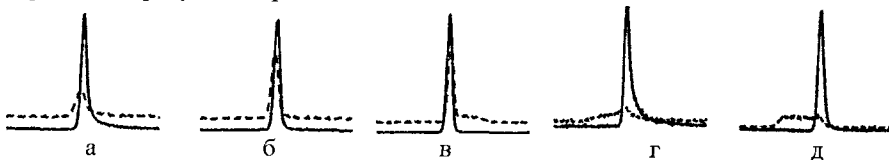
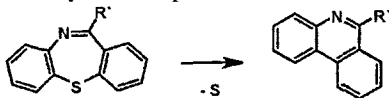


Рис. 7. Фрагменты (2 мин) селективных масс-хроматограмм кветиапина (а) и его дериватов – ацетильного (б) и триметилсилильного (в) производных, колонка (EVDX-5ms); кветиапина (г) и его ацетата (д), колонка (DB-17ms). Ионы m/z 207 (пунктирная линия), 210 (сплошная линия).

Обосновать факт термоллиза аналитов в колонке хроматографа можно, изменив селективность разделения (рис. 7, колонка DB-17ms). Изменение удерживания предполагаемых продуктов термоллиза, приводит к картине, характерной для процессов реакционной хроматографии. Расшифровка масс-спектров этих продуктов привела к заключению о наличии в их структурах фенантридинового

фрагмента (m/z 207, $C_{14}H_{11}N_2^+$). Поскольку характер кластеров молекулярных ионов также говорит об отщеплении у производных кветиапина атома серы, то можно утверждать протекание следующего процесса:



В пользу такого предположения говорит также характер зависимости отношения площади пика, образованного ионом m/z 207 к сумме площадей пиков с m/z 207 и 210 (доля m/z 207) от времени пребывания в колонке, рис. 8. (Приведена зависимость для ацетата кветиапина, температура колонки 300°C).

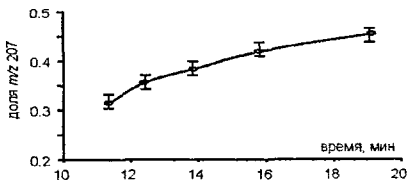


Рис. 8. Доля площади пика, образованного ионом m/z 207 от суммы площадей пиков m/z 207 и 210 для кветиапина ацетата. Абсцисса – время пребывания смеси в колонке (300°C).

Согласно нашим оценкам, основанным на близости эффективных сечений ионизации, доля продукта термоллиза в случае кветиапина ацетата составляет около 17%. Очевидная воспроизводимость процесса термоллиза (и времен удерживания) производных кветиапина приводит к получению приемлемых метрологических характеристик. Предлагается определение кветиапина и его метаболитов посредством их ацетильных производных. Полноту и воспроизводимость протекания процесса ацетилирования контролировали методом ВЭЖХ. Для пяти параллельных обработок образцов кветиапина с концентрациями 3.3 и 170 мкг/мл коэффициенты вариации составили 2.8% и 1.6% соответственно. Ни в одном случае не был обнаружен исходный кветиапин.

Для количественного определения использовали метод внутреннего стандарта (гексадецила додеканоат) и режим SIM по 4-м ионам. В диапазоне концентраций 5 – 170 мкг/мл кветиапина калибровочная зависимость хорошо аппроксимируется полиномом второго порядка ($R^2 = 0.998$), порог обнаружения 0.94 мкг/мл. СКО относительных площадей кветиапина ацетата составило 3.9% (для 11 измерений).

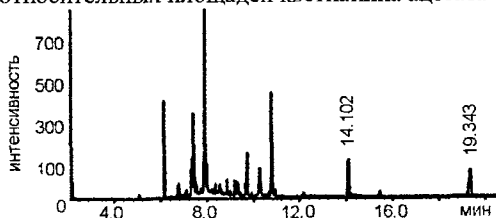


Рис 9. ГХ-МС-хроматограмма ацетилированного образца (общий ионный ток, колонка EVDX-5ms). Сигнал со временем удерживания 14.102 мин соответствует соединению VII, 19.343 – кветиапину ацетату

Метод ВЭЖХ может быть использован в качестве вспомогательного из-за малохарактеристичности УФ-спектров аналитов и плохого разделения

хроматографических зон (Рис. 10). Состав подвижной фазы – линейный градиент от 20 до 50 об.% ацетонитрила в растворе хлорной кислоты (20 мМ), 15 мин. Детектирование при 206 и 285 нм, запись спектра 200-400 нм. Калибровочная зависимость практически линейна в диапазоне 0.4 – 170 мкг/мл (длина волны 206 нм). Порог обнаружения (при объеме водимой пробы 40 мкл) составляет 20 нг/мл. СКО составило 0.7% (для пяти измерений).

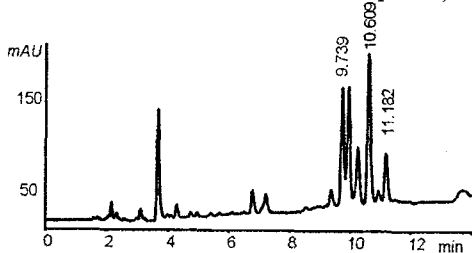


Рис. 10. ВЭЖХ-хроматограмма. Пик со временем удерживания 10.609 принадлежит кветиапину. Группа пиков в области 9.74 мин и 11.18 мин имеют УФ-спектры, подобные спектру кветиапина и, по-видимому, принадлежат его метаболитам.

Для выделения кветиапина из водных растворов применяли методы ЖЖЭ и ТФЭ. Эффективность экстракции кветиапина при разных значениях pH из водных растворов в хлороформ определяли методом ВЭЖХ. Согласно полученным результатам можно сделать вывод о том, что кветиапин экстрагируется в хлороформ только в виде однозарядной (катионной) и нейтральной форм (степень извлечения более 95%). При pH водной фазы < 2 потери кветиапина при однократной экстракции хлороформом и соотношении фаз (1:1) составили менее 5%.

ТФЭ проводили на патроне AccuBond II EVIDEX по катионообменному механизму при значении pH 4.5, обуславливающим однозарядную форму кветиапина и его производных (что было показано методом ВЭЖХ) и снижающем загрязнение элюата соединениями с более низкими значениями pK_a . Для трех процедур экстракции степень извлечения кветиапина из образцов мочи составила 99.6% при СКО 2.4%. Мы не проводили количественных оценок выделения метаболитов II и III, но эти соединения всегда присутствовали при данном способе очистки на регистрируемых хроматограммах.

Выводы

1. Измерены линейные индексы удерживания более чем для 420 соединений на среднеполярной фазе DB-17ms и определена корреляционная зависимость между индексами соединений средней полярности, измеренными на аналогах 5% и 50% фенилметилполисилоксана. Показана возможность прогнозирования (приблизительного расчета) индексов удерживания значительной доли среднеполярных соединений для целей подтверждающего скринингового определения методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием с использованием среднеполярной фазы.

2. Определены с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии приблизительные значения констант ионизации для 5 стабильных соединений, на основании которых разработаны способы выделения 12 соединений (производных, продуктов окисления) методом жидкостно-жидкостной экстракции, а также их выделения из сильно загрязненных биологических жидкостей на

обращенно-фазовых и смешанно-фазовых патронах методом твердофазной экстракции.

3. Разработан алгоритм и проведена идентификация 34 соединений, являющихся производными, метаболитами, дериватами и продуктами деградации групп бенсультапа, дротаверина и кветиапина, определены их хроматографические свойства, получены ультрафиолетовые и масс-спектры. Предложен метод обнаружения данных соединений в биологических жидкостях в условиях обзорного анализа.

4 Разработаны способы количественного определения бенсультапа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в моче; дротаверина и кветиапина методом газовой хромато-масс-спектрометрии в моче. Пороги обнаружения для бенсультапа, дротаверина и кветиапина составляют 0.05 мкг/мл, 470 нг/мл и 0.94 мкг/мл, соответственно.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. Gas and liquid chromatography–mass spectrometry studies on the metabolism of the synthetic phenylacetylindole cannabimimetic JWH-250, the psychoactive component of smoking mixtures / A. Grigoryev, A. Melnik, S. Savchuk, A. Simonov, V. Rozhanets // J. Chromatogr. B.- 2011.- V. 879.- P. 2519– 2526.

2. Григорьев А.М. Хроматографические методы определения дротаверина и идентификация его производных и метаболитов в биообразцах. / А.М. Григорьев, А.А. Мельник, Л.В. Рудакова // Изв. вузов. Химия и химическая технология. - 2012. - Т. 55, вып. 2. - С. - 18-23

3. Григорьев А.М. Идентификация и определение производных нереистоксина методами ГЖХ-МС и ВЭЖХ для целей судебно-химического и токсикологического анализа / А.М. Григорьев, А.А.Мельник, Л.В. Рудакова // Сорбционные и хроматографические процессы.- 2008. - Т. 8, вып. 5. - С. 766-778.

4. Мельник А.А. Определение кветиапина, его производных и метаболитов методами газожидкостной хромато-масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии в биологических образцах / А.А. Мельник, А.М. Григорьев, Л.В Рудакова // Сорбционные и хроматографические процессы.- 2010.- Т. 10, вып. 1. - С. 35-46.

5. Григорьев А.М. ГХ-МС в исследовании термолabileльных производных дротаверина / А.М. Григорьев, А.А. Мельник, Л.В. Рудакова // IV съезд ВМСО. III Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы».- Москва, 2009. - С. 51.

6. Григорьев А.М. Масс-спектральные характеристики и индексы удерживания (ГЖХ) кветиапина, его производных и метаболитов / А.М. Григорьев, А.А. Мельник, Л.В. Рудакова // IV съезд ВМСО. III Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы».- Москва, 2009. - С. 61.

7. Григорьев А.М. Определение нереистоксина, его производных и метаболитов хроматографическими методами в биообъектах / А.М. Григорьев, А.А.

Мельник, Л.В. Рудакова // Тезисы докладов VII Всеросс. конф. по анализу объектов окружающей среды "Экоаналитика-2009". - Йошкар-Ола, 2009. - С. 74-75.

8. Григорьев А.М. Кошвергенция удерживания гомологических рядов в газовой и жидкостной хроматографии / А.М. Григорьев, А.А. Мельник, Л.В. Рудакова // Всероссийская конференция "Теория и практика хроматографии. Хроматография и нанотехнологии". тез.докл. - Самара, 2009 г. - С. 32.

9. Григорьев А.М. Определение дротаверина, его производных и метаболитов: ГЖХ или ВЭЖХ? / А.М. Григорьев, А.А. Мельник, Л.В. Рудакова // Всероссийская конференция "Теория и практика хроматографии. Хроматография и нанотехнологии". тез.докл.- Самара, 2009 г. - С. 95.

10. Григорьев А.М. Компенсационное поведение в газожидкостной хроматографии гомологических рядов / А.М. Григорьев, А.А. Мельник, О.Б. Рудаков // Съезд аналитиков России "Аналитическая химия - новые методы и возможности" тез.докл.- Москва, 2010 г. - С. 87.

11. Григорьев А.М. Обзорные библиотеки для автоматизированных хромато-масс-спектрометрических определений в области судебной химии и химической токсикологии с применением фаз разной полярности / Григорьев А.М. Мельник А.А. Савчук С.А. // Съезд аналитиков России "Аналитическая химия - новые методы и возможности" тез.докл.- Москва, 2010 г. - С. 255-256.

12. Григорьев А.М. Физический смысл и координаты областей компенсации удерживания гомологичный рядов в газожидкостной хроматографии / А.М. Григорьев, А.А. Мельник, О.Б. Рудаков // мат. V Всерос. Конф. «физико-химические процессы в конденсированных средах и на межфазных границах Фагран 2010».- Воронеж, 2010 г. - С. 700-703.

Работы №№ 1-4 опубликованы в изданиях, соответствующих списку ВАК РФ.

Подписано в печать 12.11.13. Формат 60×84¹/₁₆. Усл. печ. л. 1.
Тираж 120 экз. Заказ 1170.

Отпечатано с готового оригинал-макета
в типографии Издательско-полиграфического центра
Воронежского государственного университета.
394000, Воронеж, ул. Пушкинская, 3