ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 614.272, 615.074
ГРНТИ 31.23.39

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПРОБОПОДГОТОВКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ ДЛЯ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРРОЛИДИНОФЕНОНА

DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2020.3.81.1158

Сынбулатов Ирек Вадимович
аспирант кафедры химии фармацевтического факультета
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89
Воронин Александр Васильевич
д. фарм. н.,
заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89

DEVELOPMENT OF A SAMPLE PREPARATION PROCEDURE OF BIOLOGICAL FLUIDS BY SOLID-PHASE EXTRACTION OF PYRROLIDINOPHENONE DERIVATIVES

АННОТАЦИЯ

На данный момент актуальным вопросом судебно-химической экспертизы является разработка методик пробоподготовки, обеспечивающих высокий уровень селективности и доказательность результатов исследования методом хромато-масс-спектрометрического анализа (ГХ-МС) с квадрупольным детектором. Цель исследования – разработка методики пробоподготовки биологических жидкостей методом твердофазной экстракции с применением модельного соединения фенилпирацетама и определение ее метрологических характеристик**.** Материалы и методы. Объектами исследования были модельные образцы биологических жидкостей (крови и мочи) с содержанием лекарственного вещества фенилпирацетама 20.0-6000.0 нг/мл. Разработку методики твердофазной экстракции осуществляли путем модификации методики разделения на сорбентах смешанного типа, применяемой в рутинной практике для скринингового исследования на наркотические средства и психотропные вещества, в том числе на производные пирролидинофенона. В качестве элюента для десорбции фенилпирацетама с молекулярно импринтированного сорбента использовали спирт изопропиловый. Результаты. Сравнение величин средней степени извлечения фенилпирацетама (для диапазона концентраций 20.0-6000.0 нг/мл) из водных растворов, образцов крови и мочи показывает, что степень извлечения из модельных образцов крови на 6% ниже по сравнению со степенью извлечения из водных растворов, и на 4% ниже – по сравнению с образцами мочи. Относительные погрешности определения степени извлечения из образцов крови, используемые для оценки правильности методики пробоподготовки, для всех уровней концентраций фенилпирацетама не превышали значения ±12%. Для верхнего уровня концентрации (1500.0 нг/мл) погрешность составляет ±11.5%. Минимальное значение наблюдалось на среднем уровне концентрации 500.0 нг/мл и составило ±5.3%. Относительные погрешности определения степени извлечения из образцов мочи для всех уровней концентраций не превышали значения ±6%. Для верхнего уровня концентрации (1500.0 нг/мл) погрешность составляет около ±4%. Сходимость результатов определения степени извлечения фенилпирацетама из модельных образцов крови на нижнем уровне концентраций была 16.1%, на верхнем уровне концентраций – 6.1%. Для образцов мочи сходимость результатов определений степени извлечения фенилпирацетама на нижнем уровне концентраций была 12.6%, на верхнем уровне концентраций – около 5%.

ABSTRACT

The topical issue of forensic toxicology is the development of sample preparation procedures that provide a high level of selectivity and evidence of the results by gas chromatography-mass spectrometric analysis (GC-MS) with a quadrupole detector. The aim of the study is to develop a technique for sample preparation of biological fluids by solid-phase extraction (SPE) using a model compound phenylpiracetam and to measure its metrological characteristics. Materials and methods. The objects of the study were model samples of biological fluids (blood and urine) with a phenylpiracetam concentration of 20.0-6000.0 ng / ml. The SPE procedure was developed by modifying the separation technique on mixed-type sorbents used in routine practice for screening studies for drugs, including pyrrolidinophenone derivatives. Isopropyl alcohol was used as an eluent for desorption of phenylpiracetam from the molecularly imprinted sorbent. Results. Comparison of the average recovery of phenylpiracetam (for concentration range of 20.0-6000.0 ng / ml) from aqueous solutions, blood and urine samples shows that the recovery from model blood samples is 6% lower than the recovery from aqueous solutions and 4% lower compared to urine samples. The relative errors in determining the degree of extraction from blood samples used to assess the correctness of the sample preparation procedure did not exceed ± 12% for all levels of

phenylpiracetam concentrations. For the upper concentration level (1500.0 ng / ml), the error is ± 11.5%. The minimum value was observed at an average concentration level of 500.0 ng / ml and amounted to ± 5.3%. The relative errors in determining the degree of extraction from urine samples for all concentration levels did not exceed ± 6%. For the upper concentration level (1500.0 ng / ml), the error is about ± 4%. The precision of the results of phenylpiracetam determining recovery from model blood samples at the lower level of concentrations was 16.1%, at the upper level of concentrations - 6.1%. For urine samples, the precision of the recovery at the lower concentration level was 12.6%, at the upper concentration level - about 5%.

Ключевые слова: производные пирролидинофенона, твердофазная экстракция, судебно-химическая экспертиза.

Keywords: pirrolidinophenone derivatives, solid phase extraction, analytical toxicology.

Введение. Теоретической основой разработки методики пробоподготовки биологических жидкостей при исследовании на производные пирролидинофенона методом твердофазной экстракции (ТФЭ) с применением молекулярно импринтированного полимера на основе производных акриловой кислоты было повышение селективности процедуры анализа на этапе подготовки пробы, а не на этапе регистрации аналитического сигнала (измерения) [1]. Повышение селективности непосредственно регистрации аналитического сигнала связано с необходимостью применения дорогостоящего аналитического оборудования для газовой или жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией, недоступного для лабораторий большинства экспертных учреждений [2]. На данный момент актуальным вопросом судебно-химической экспертизы является разработка методик пробоподготовки обеспечивающих высокий уровень селективности и доказательность результатов исследования методом хромато-масс-спектрометрического анализа (ГХ-МС) с квадрупольным детектором [3].

Цель исследования – разработка методики пробоподготовки биологических жидкостей методом твердофазной экстракции с применением модельного соединения фенилпирацетама и определение ее метрологических характеристик**.**

Материалы и методы

Объектами исследования были модельные образцы биологических жидкостей (крови и мочи) с содержанием лекарственного вещества фенилпирацетама 20.0-6000.0 нг/мл. При исследовании образцов крови проводили удаление форменных элементов и депротеинизацию ацетонитрилом.

Разработку методики твердофазной экстракции осуществляли путем модификации методики разделения на сорбентах смешанного типа, применяемой в рутинной практике для скринингового исследования на наркотические средства и психотропные вещества, в том числе на производные пирролидинофенона [4]. С учетом реализации удерживающего варианта ТФЭ нанесение пробы осуществляли после уравновешивания сорбента фосфатным буферным раствором с значением pH 8.5, скорость подачи анализируемой пробы не превышала 5 мл/мин, объем пробы составлял 1 мл. В качестве элюента для десорбции фенилпирацетама с молекулярно импринтированного сорбента использовали спирт изопропиловый. ГХ-МС анализ образцов модельных биологических жидкостей проводили по методике [5].

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлены результаты исследования степени извлечения фенилпирацетама из модельных образцов биологических жидкостей (крови, мочи) в диапазоне концентраций 20.0-6000.0 нг/мл, а также характеристики, необходимые для оценки процесса сорбции и влияющие на эффективность процедуры пробоподготовки.

Таблица 1

Степень извлечения фенилпирацетама из модельных биологических жидкостей и сорбционные характеристики молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты

Концентрация фенилпирацетама в биологической жидкости, нг/мл	Степень извлечения фенилпирацетама, %	Масса фенилпирацетама, удерживаемая в равновесных условиях сорбции, нг	Сорбция фенилпирацетама, нг/мг
Кровь			
20.0	53.4	10.68	0.11
50.0	61.6	30.80	0.31
100.0	76.5	76.50	0.77
200.0	83.9	167.80	1.68
500.0	84.2	421.00	4.21
1000.0	88.4	884.00	8.84
1500.0	87.6	1314.00	13.14
2000.0	90.1	1802.00	18.02

5000.0	89.1	4455.00	44.55
6000.0	81.8	4908.00	49.08
Моча			
20.0	57.3	11.46	0.11
50.0	66.4	33.20	0.33
100.0	79.1	79.10	0.79
200.0	86.4	172.80	1.73
500.0	86.6	433.00	4.33
1000.0	91.3	913.00	9.13
1500.0	92.4	1386.00	13.86
2000.0	91.9	1838.00	18.38
5000.0	91.3	4565.00	45.65
6000.0	86.2	5172.00	51.72

*условия анализа: 100 мг сорбента; объем пробы 1 мл; уравновешивание фосфатным буферным раствором с значением pH 8.5; элюирование изопропиловым спиртом.

Сравнение величин средней степени извлечения фенилпирацетама (для диапазона концентраций 20.0-6000.0 нг/мл) из водных растворов, образцов крови и мочи показывает, что степень извлечения из модельных образцов крови на 6% ниже по сравнению со степенью извлечения из водных растворов, и на 4% ниже – по сравнению с образцами мочи (рис. 1). Степень извлечения фенилпирацетама из образцов мочи статистически достоверно не отличается от степени извлечения из водного раствора. Таким образом, только для образцов крови наблюдается влияние матрицы на извлечение целевого соединения, а также возможно, что снижение извлечения связано с потерями фенилпирацетама на этапе депротеинизации ацетонитрилом.

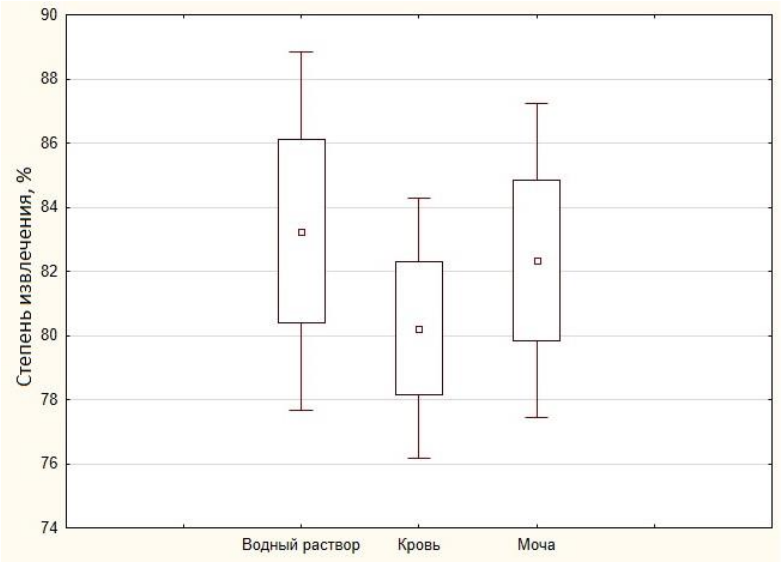

Рисунок 1

Сравнение средней степени извлечения модельного соединения фенилпирацетама (%) из водных растворов и образцов биологических жидкостей

Параметры правильности и воспроизводимости методики пробоподготовки методом ТФЭ оценивали путем анализа модельных образцов крови и мочи для трех уровней концентраций фенилпирацетама: нижний – 50.0 нг/мл, средний – 500.0 нг/мл и верхний – 1500.0 нг/мл. В качестве принятого опорного значения при оценке правильности использовали степень извлечения фенилпирацетама из водного раствора соответствующей концентрации. Определяли сходимость результатов измерений (относительное стандартное отклонение), полученных в 5 разных аналитических циклах – между сериями параллельных определений в разные дни (табл. 2).

Таблица 2

Результаты оценки правильности и прецизионности показателя «степень извлечения» методики пробоподготовки биологических жидкостей методом твердофазной экстракции на молекулярно импринтированном сорбенте

Анализируемый образец	Уровни концентраций фенилпирацетама, нг/мл	Степень извлечения, %	Правильность, %	Сходимость между сериями параллельных определений, %
Кровь (после депротеинизации ацетонитрилом)	Нижний 50.0	61.6	6.5	16.1
	Средний 500.0	84.2	5.3	8.3
	Высокий 1500.0	87.6	11.5	6.1
Моча	Нижний 50.0	66.4	5.2	12.6
	Средний 500.0	86.6	3.7	9.5
	Высокий 1500.0	92.4	3.5	5.4

Относительные погрешности определения степени извлечения из образцов крови, используемые для оценки правильности методики пробоподготовки, для всех уровней концентраций фенилпирацетама не превышали значения ±12%. Для верхнего уровня концентрации (1500.0 нг/мл) погрешность составляет ±11.5%. Минимальное значение наблюдалось на среднем уровне концентрации 500.0 нг/мл и составило ±5.3%.

Относительные погрешности определения степени извлечения из образцов мочи для всех уровней концентраций не превышали значения ±6%. Для верхнего уровня концентрации (1500.0 нг/мл) погрешность составляет около ±4%.

Сходимость результатов определения степени извлечения фенилпирацетама из модельных образцов крови на нижнем уровне концентраций была 16.1%, на верхнем уровне концентраций – 6.1%.

Для образцов мочи сходимость результатов определений степени извлечения фенилпирацетама на нижнем уровне концентраций была 12.6%, на верхнем уровне концентраций – около 5%.

С увеличением концентрации фенилпирацетама в пробах крови и мочи сходимость результатов определения степени извлечения увеличивалась, т.е. уменьшалась величина относительного стандартного отклонения, характеризующего степень разброса результатов.

Принципиальная схема методики пробоподготовки биологических жидкостей методом ТФЭ при исследовании на производные пирролидинофенона представлена на рисунке 2.

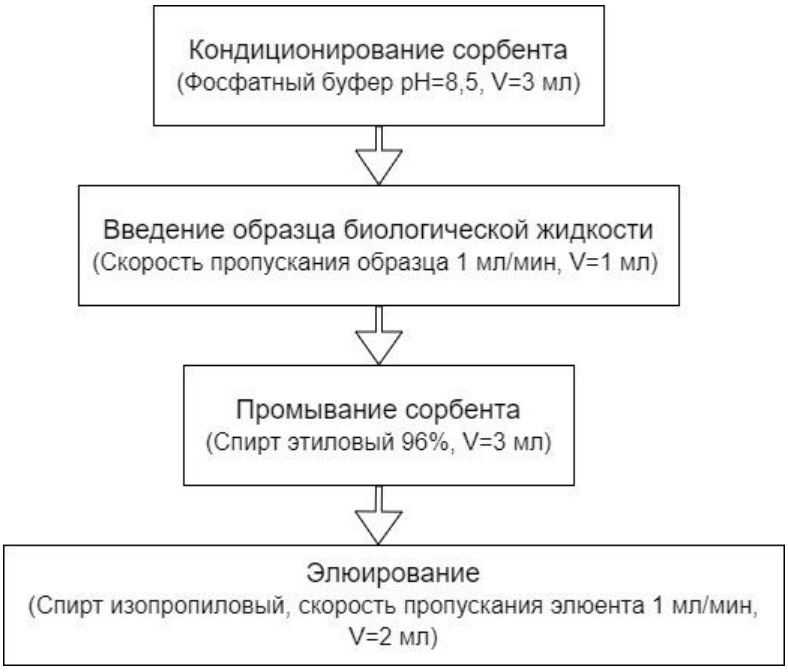

Рисунок 2

Схема пробоподготовки биологических жидкостей методом ТФЭ при исследовании на производные пирролидинофенона с применением молекулярно импринтированного сорбента на основе производны акриловой кислоты.

Заключение. Разработана методика пробоподготовки биологических жидкостей (крови, мочи) методом ТФЭ с применением молекулярно импринтированного сорбента на основе акриламида. Определены ее метрологические характеристики: правильность

определения степени извлечения фенилпирацетама не превышает ±12% для образцов крови и ±6% для образцов мочи; сходимость – не более 16% и 13% для образцов крови и мочи соответственно.

Список литературы:

1. Lehmann, S. Organ distribution of 4-MEC, MDPV, methoxetamine and α-PVP: comparison of QuEChERS and SPE / S. Lehmann [et al.] // Forensic Toxicology. – 2018. – P. 1-14.

2. Al-Saffar, Y. Multicomponent LC-MS/MS screening method for detection of new psychoactive drugs, legal highs, in urine-experience from the Swedish population / Y. Al-Saffar, N. Stephanson, O. Beck // Journal of Chromatography B. – 2013. – V. 930. – №. 1. – P. 112-120.

3. Saito, T. SPME–GC–MS analysis of α-pyrrolidinovaleorophenone in blood in a fatal poisoning case / T. Saito [et al.] // Forensic toxicology. – 2013. – V. 31. – №. 2. – P. 328-332.

4. Мелентьев, А.Б. Дизайнерские наркотики. Метаболизм и подходы к анализу в биологических средах / А.Б. Мелентьев, С.С. Катаев, О.Н. Дворская. – М.: Издательство "Перо", 2016. – 326 с. [Melent'ev, A.B. Dizajnerskie narkotiki. Metabolizm i podhody k analizu v biologicheskih sredah / A.B. Melent'ev, S.S. Kataev, O.N. Dvorskaja. – M.: Izdatel'stvo "Pero", 2016. – 326 s. (In Russ.)].

5. Дворская, О.Н. Опыт применения твердофазной экстракции в скрининге лекарственных и наркотических веществ в крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / О.Н. Дворская, И.П. Крохин, С.С. Катаев // Хим.-фарм. журнал. – 2017. – Т.51, №3. – С. 36-40. [Dvorskaja, O.N. Opyt primenenija tverdofaznoj jekstrakcii v skrininge lekarstvennyh i narkoticheskih veshhestv v krovi metodom gazovoj hromatografii s mass-spektrometricheskim detektirovaniem / O.N. Dvorskaja, I.P. Krohin, S.S. Kataev // Him.-farm. zhurnal. – 2017. – T.51, №3. – S. 36-40. (In Russ.)].