

*mass spectrometry detector. The obtained spectra prove beyond doubt the presence or absence of these substances in the analyzed sample as they serve as, so to say, «fingerprint» of every compound.*

*Keywords: high performance liquid chromatography, mass spectrometry detector, narcotics, psychotropic substances.*

УДК 543.544

**М. А. Савченко**, завідувач токсикологічного відділення Черкаського обласного бюро судово-медичної експертизи, **Г. П. Петюнін**, завідувач кафедри клінічної біохімії, судово-медичної токсикології та фармації Харківської медичної академії післядипломної освіти, доктор фармацевтичних наук, професор

### ГАЗОХРОМАТОГРАФІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ГІДАЗЕПАМУ, ЙОГО МЕТАБОЛІТІВ І ПРОДУКТІВ ГІДРОЛІЗУ

*Розглянуто результати взаємодії гідазепаму, його метаболітів і продуктів гідролізу із різними реактивами для дериватизації. Репрезентовано експериментальні дані досліджень отриманих дериватів за допомогою газорідинної хроматографії.*

*Ключові слова: гідазепам, метаболіти, дериватизація, газорідинна хроматографія.*

Гідазепам вітчизняний препарат, діючою речовиною якого є 7-бром-5-феніл-1-гідазіно-карбоксиметил-1,2-дигідро-3Н-1,4-бензодіазепін-2-он, який являє собою похідне 1,4-бензодіазепіну. Від інших препаратів цієї групи гідазепам відрізняється слабо вираженою міорелаксуючою дією, відсутністю сонливості після його застосування та низькою токсичністю<sup>1</sup>.

Незважаючи на переваги гідазепаму перед іншими препаратами групи похідних 1,4-бензодіазепіну, він здатний посилювати дію фенаміну, 5-окситриптофану, снодійних засобів, дію алкоголю, нейролептиків і наркотичних анальгетиків<sup>2</sup>, що створює передумови для зловживання гідазепамом з метою посилення наркотичного ефекту, а також використання його із кримінальним наміром. Останні обставини викликають потребу в розробленні аналітичних методів, які б дали змогу ідентифікувати як самий препарат (у таблетці, порошку або розчині), так і його метаболіти в біологічному матеріалі в умовах неспрямованого скринінгу.

<sup>1</sup> Див.: Павловський В. І. Селективний анксиолітик гідазепам ІС / В. І. Павловський, А. В. Птяшко // Наука та інновації. — 2007. — Т. 3. — № 4. — С. 76–77; Гідазепам / [С. А. Андронати, Т. А. Воронина, Н. Я. Головенко и др.]; отв.ред. С. А. Андронати. — К.: Наук. думка, 1992. — С. 15–16, 50–52, 63–75, 120–131; Інструкція для медичного застосування препарату ГІДАЗЕПАМ ІС [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=8274>.

<sup>2</sup> Див.: Інструкція для медичного застосування препарату ГІДАЗЕПАМ ІС.

Існуючі методи визначення гідазепаму та його метаболіту – дезалкілгідазепаму у вигляді субстанцій або виділених з біологічного матеріалу<sup>1</sup> передбачають наявність препарату та його метаболіту в об'єктах дослідження. Імуноферментні методи<sup>2</sup> не є специфічними й потребують обов'язкового підтвердження іншими методами. У методі тонкошарової хроматографії (ТШХ)<sup>3</sup> використовується малоспецифічний реактив Драгендорфа та досліджується лише сам гідазепам. Разом із тим той факт, що найбільш поширеним і водночас чутливим інструментальним аналітичним методом визначення різноманітних речовин у токсикологічних лабораторіях є метод газорідинної хроматографії та повна відсутність у літературі газохроматографічних характеристик гідазепаму і його метаболітів спонукали нас до вивчення цього питання.

У результаті досліджень з вивчення поведінки гідазепаму та його метаболітів в умовах кислотного гідролізу, який використовується в практиці токсикологічних досліджень похідних 1,4-бензодіазепіну методами ТШХ і хроматомас-спектрометрії, ми виявили та ідентифікували амінобром-бензофенон (АББ) (1), метиламінобромбензофенон (МББ) (2), карбокси-метиламінобромбензофенон (АКББ) (3) і карбоксиметилгідазепам (4) (рис. 1). У сечі людей, які приймали гідазепам, крім N<sup>1</sup> – дезалкілгідазепаму (5)<sup>4</sup> ми також виявили в значно більшій кількості карбоксиметилгідазепам (4). Отже, у подальшому досліджувалися ці п'ять речовин.

Газохроматографічні дослідження проводили на хромато-мас-спектрометрі Agilent 6890N/5973N/FID із пневматичним мікропотоковим перемікачем Діна та додатковим детектором іонізації в полум'ї. Колонка № 1 – кварцова капілярна HP-5MS 30 м × 0,25 мм, вихід колонки під'єднано до детектора іонізації в полум'ї. Колонка № 2 – кварцова капілярна DB-17MS 30 м × 0,25 мм, кінець колонки безпосередньо входить в мас-спектрометр. Температура інжектора – 250 °С, зони уводу зразка в мас-спектрометр –

<sup>1</sup> Див.: Определение гдазепаму и феназепаму методом ВЭЖХ в смывах с поверхностей фармоборудования / [Е. О. Витюкова, А. В. Егорова, О. Д. Войтюк, З. А. Гишер] // Тези доповідей річної сесії Наукової ради з проблеми «Аналітична хімія» Національної академії наук України (Новий Світ, 25–30 трав. 2009 р.). — К.: Видавець В. С. Маринюк, 2009. — С. 15; Спектрофотометрическое измерение концентраций гдазепаму в воздухе рабочей зоны: МУК 4.1.213-96 [Електронний ресурс]. — Режим доступу: [http://www.znaytovar.ru/gost/2/MUK\\_4121396\\_Spektrofotometr.html](http://www.znaytovar.ru/gost/2/MUK_4121396_Spektrofotometr.html).

<sup>2</sup> Див.: Хемилюминисцентный иммуноферментный метод определения гдазепаму / [М. А. Мягкова, Ж. Н. Трубачева, Е. А. Брюн и др.] // Суд.-мед. експертиза. — 2001. — № 2. — С. 43–46; Твердофазный иммуноферментный метод количественного определения гдазепаму в моче человека / [М. А. Мягкова, А. В. Смирнов, Ж. Н. Трубачева и др.] // Хим.-фармац. журнал. — 2000. — № 10. — С. 49–51.

<sup>3</sup> Див.: *Ткачук Л. І.* Методи виявлення лікарського засобу гідазепаму – похідного 1,4-бензодіазепіну / Л. І. Ткачук, О. Д. Туркевич, М. М. Кучер // Фармація України. Погляд у майбутнє: матер. VII Нац. з'їзду фармацевтів України (Харків, 15–17 верес. 2010 р.): у 2-х т. — Х.: НФаУ, 2010. — Т. 1. — С. 180.

<sup>4</sup> Див.: Биотрансформация и фармакокинетика гдазепаму у животных разных видов и человека / [Г. Б. Кольванов, В. П. Жердев, А. М. Чирков и др.] // Эксперимент. и клинич. фармакология. 1993. — Т. 56. — № 3. — С. 48–50.

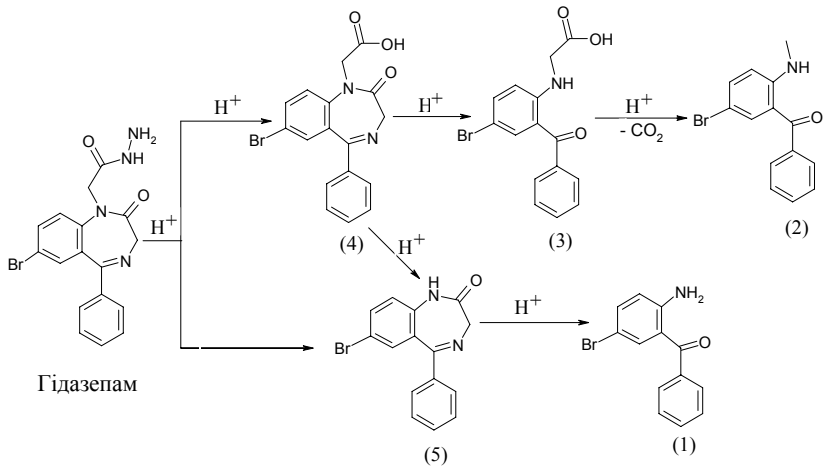
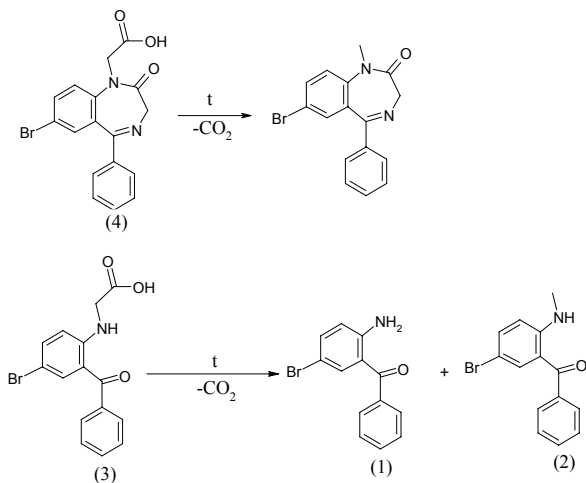


Рис. 1. Гідроліз гідазепаму та його метаболітів

280 °С, джерела іонів – 230 °С, квадруполя – 150 °С, детектора іонізації в полум'ї – 250 °С. Режим іонізації мас-спектрометра – електронний удар, енергія електронів – 70 еВ, діапазон сканування 40–700 а. о. м., поріг – 100, швидкість сканування – 4,29 скан./с. Режим програмування температури термостата: 70 °С – 2 хв, далі підйом до 210 °С зі швидкістю – 45 °С/хв, потім підйом до 320 °С зі швидкістю – 15 °С/хв та витримування при цій температурі 17,56 хв. Тиск газу-носія (гелію) на вході в першу колонку – 179,66 кПа (26,06 psi), другу – 133,06 кПа (19,30 psi). Режим уведення проби – 1 мкл без поділу потоку. Хроматографування досліджуваних речовин проводили на першій колонці (HP-5MS). З метою з'ясування природи речовини при появі піку останньої потік газу-носія за допомогою пневматичного перемикача Діна перенаправляли на другу колонку, яка безпосередньо під'єднана до мас-спектрометра.

Ідентифікацію проводили з використанням бібліотеки мас-спектрів NIST-11, Wiley Registry 8 e, PMW\_tox3, SWGDRUG (v1.7) та власну. Індекси утримування Ковача визначалися за допомогою суміші нормальних парафінів C<sub>16</sub>–C<sub>44</sub>.

При введенні у випарник хроматографа нативних речовин безпосередньо можна визначити лише речовини (1), (2) та (5), які достатньо добре хроматографуються без розкладання, лише для речовини (1) характерне утворення піку із «хвостом», що пов'язане із її відносною полярністю. При інжекції речовини (4) унаслідок термічного декарбоксілювання на хроматограмі виявляється лише N<sup>1</sup>-метильний аналог дезалкілгідазепаму, але при інжекції речовини (3) основним процесом термічного розкладання є повне N<sup>1</sup>-дезалкілювання із незначним декарбоксілюванням, унаслідок чого на хроматограмі виявляється речовина (1) і незначна кількість речовини (2) (рис. 2).



**Рис. 2.** Термічний розклад речовин (4) та (3) в інжекторі хроматографа

З метою запобігання термічній деструкції речовин (3) та (4) і з огляду на їх природу нами було використано дериватизацію діазометаном та двома реактивами для силювання – N,O-біс(триметилсиліл)-трифторацетамід і N-*трет*-бутилдиметилсиліл-N-метилтрифторацетамід, з якими утворюються стійкі та легкі похідні.

Для поліпшення хроматографічних характеристик амінобензофенонів використовували дериватизацію найбільш поширеними ангідридами кислот – оцтовим, трифтороцтовим і гептафтормасляним. В експериментах з одним оцтовим ангідридом та його сумішшю із піридином як каталізатором будь-яких переваг у використанні піридину при ацилюванні речовин (1) і (2) нами не виявлено. Для речовини (3) також отримано подвійне похідне – метиловий ефір/трифтороцтовий або гептафтормасляний ацил, яке характеризується значною леткістю та стабільністю. При взаємодії речовин (1) і (2) із реактивами для силювання, лише речовина (1) і тільки з N,O-біс(триметилсиліл)трифторацетамідом дає триметилсилільне похідне, що, на нашу думку, імовірно, пов'язано із стеричними труднощами при введенні об'ємних триметилсилільної та *трет*-бутилдиметилсилільної груп. Для речовини (5), як і для всіх аналогічних сполук<sup>1</sup>, характерне утворення триметилсилільного та *трет*-бутилдиметилсилільного похідного.

Таким чином, при дослідженні продуктів гідролізу гідразепаму і його метаболітів оптимальним є використання спочатку метилювання, а потім взаємодію із ангідридами кислот. При дослідженні екстрактів з нативних біологічних об'єктів, у яких одночасно присутні як речовина (4), так і (5),

<sup>1</sup> Див.: Recommended Methods for the Detection and Assay of Benzodiazepines in Biological Specimens Manual for Use by National Laboratories : ST/NAR/27. — N. Y. : United Nations, 1997. — С. 81–88.

і які при загальному скринінгу попадають в екстракти з кислого середовища, доцільно використовувати дериватизацію силюючими реагентами. При дослідженні недериватизованих екстрактів ознаками наявності гідазепаму та його метаболітів можуть бути: при дослідженні гідролізатів – сполуки (1), (2) та N<sup>1</sup>-метильне похідне дезалкілгідазепаму, при дослідженні нативних екстрактів – сполука (5) і N<sup>1</sup>-метильне похідне дезалкілгідазепаму.

Безпосередньо сам нативний гідазепам не хроматографується. Взаємодія із ангідридами кислот не приводить до утворення однієї стійкої сполуки. Повне N,N-ди(тримети, або *трет*-бутилдиметилсиліл)-похідне, разом із значно більшою кількістю продуктів деструкції, спостерігалось лише при введенні дуже значних кількостей речовини. Найбільш термічно стабільною сполукою виявився диметилкетазин гідазепаму, який для покращення хроматографічних характеристик додатково дериватизували силюючими реагентами (рис. 3).

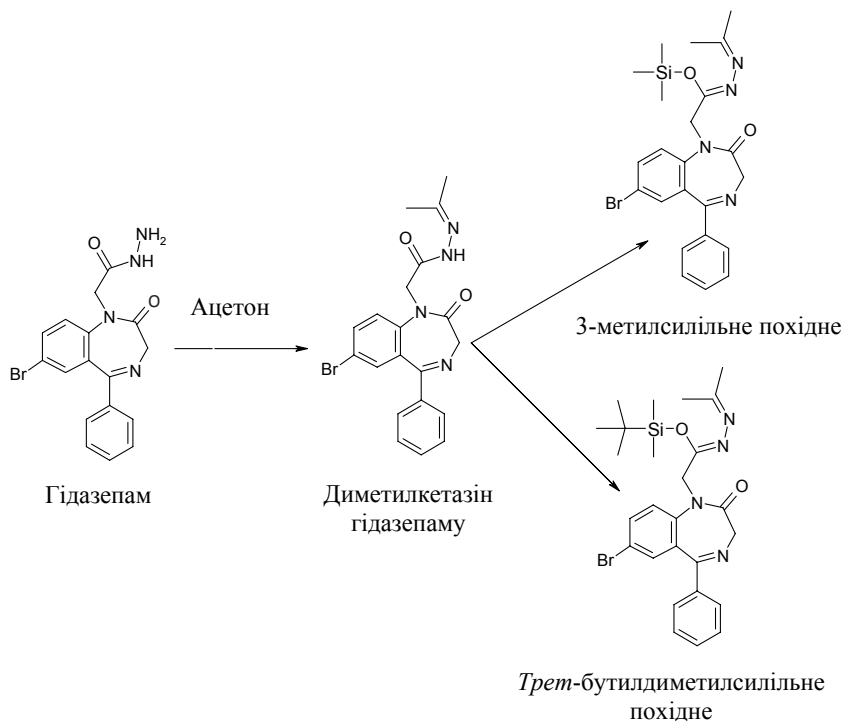


Рис. 3. Утворення похідних гідазепаму

Визначено індекси утримання Ковача та час утримання всіх отриманих речовин і їх стійких дериватів (таблиця), а також речовин, наявність яких на хроматограмах недериватизованих екстрактів може вказувати на присутність

гідазепаму та його метаболітів, що може бути використане в практиці токсикологічного скринінгу.

Таблиця

**Хроматографічні параметри досліджуваних речовин і їх похідних**

Речовина	Індекси та час утримання на капілярній колонці HP-5MS						
	нативна речовина	Похідне					
		Me	AC	TFA	HFB	TMS	TBDMS
АББ (1)	2226 12,332	н/у	2405 13,141	2130 11,871	2119 11,817	2708 14,625	н/у
МББ (2)	2277 12,563	н/у	2432 13,267	2182 12,126	2144 11,94	н/у	н/у
АКББ (3)	н/х	2628 14,198	н/х	н/х	н/х	2691 14,534	2941 16,045
АКББ-метиловий ефір	2628 14,198		н/у	2566 13,89	2378 13,019	н/у	н/у
Карбоксиметил-гідазепам (4)	н/х	2919 15,89	н/у	н/у	н/у	2970 16,236	3230 18,575
Дезалкіл-гідазепам (5)	2881 15,651	н/у	н/у	н/у	н/у	2451 13,355	2687 14,513
Дезалкілгідазепам, N <sup>1</sup> -метил	2659 14,363	н/у	н/у	н/у	н/у	н/у	н/у
Диметилкетазин гідазепаму	3528 22,763	н/у	н/у	н/у	н/у	3180 17,982	3402 20,991

**П р и м і т к и:**

н/у – речовина не утворює похідного із даним реактивом;

н/х – речовина не хроматографується;

Me – метиловий ефір;

AC – оцтове похідне;

TFA – трифтороцтове похідне;

HFB – гептафтормасляне похідне;

TMS – триметилсилільне похідне;

TBDMS – *трет*-бутилдиметилсилільне похідне.

Отже, у результаті досліджень уперше проведено газохроматографічне розділення гідазепаму у вигляді силільних похідних диметилкетазину, його метаболітів і продуктів гідролізу – амібромбензофенонів як нативних речовин, так і дериватів.

**GAZOXROMATOGRAPHISCHESKOE ISSLEDOVANIE GIDAZEPAMA,  
EGO METABOLITOV I PRODUKTOV GIDROLIZA**

*Савченко М. А., Петюнин Г. П.*

*Рассмотрены результаты взаимодействия гидазепама, его метаболитов и продуктов гидролиза с различными реактивами для дериватизации. Представлены экспериментальные данные хроматографических исследований полученных дериватов с помощью газожидкостной хроматографии.*

*Ключевые слова: гидазепам, метаболиты, дериватизация, газожидкостная хроматография.*

**GAS CHROMATOGRAPHY STUDY OF HYDAZEPAM,  
ITS METABOLITES AND HYDROLYSIS PRODUCTS**

*Savchenko M. A., Petiunin H. P.*

*The article deals with the outcomes of interaction between hydazepam, its metabolites and hydrolysis products with various agents to achieve derivatization. It also present experimental data of chromatography study of the obtained derivatives with the use of gas-liquid chromatography.*

*Keywords: hydazepam, metabolites, derivatization, gas-liquid chromatography.*

УДК 343.98:340.67, 547.26

*К. М. Даньшина*, старший науковий співробітник Харківського НДІСЕ

**ДОСЛІДЖЕННЯ НАРКОТИЧНИХ, СИЛЬНОДІЮЧИХ,  
ОТРУЙНИХ, ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ТА ПСИХОТРОПНИХ  
РЕЧОВИН В АЛКОГОЛЬНИХ І БЕЗАЛКОГОЛЬНИХ НАПОЯХ  
МЕТОДОМ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ  
ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ СКРИНІНГУ**

*Наведено експериментальні дані щодо виявлення наркотичних, сильнодіючих, отруйних лікарських засобів та психотропних речовин в алкогольних і безалкогольних напоях методом тонкошарової хроматографії. Викладено детальний хід скринінгового дослідження.*

*Ключові слова: тонкошарова хроматографія, хроматографічні плями, скринінг, діюча речовина, лікарський засіб.*

Використання не з медичними цілями лікарських засобів, віднесених до сильнодіючих, отруйних, наркотичних або психотропних речовин, має місце як в Україні, так і за її межами, що завдає великої шкоди здоров'ю людей і призводить до соціальної небезпеки. При розслідуванні отруєнь, звалтувань, крадіжок, убивств, махінацій та інших злочинів в експертні установи слідчими органами на дослідження надсилаються різноманітні напої – як алкогольні, так і безалкогольні. Перед експертами виникає необхідність вирішення діагностичних завдань, пов'язаних з визначенням наявності й природи лікарських наркотичних, сильнодіючих, отруйних засобів, психотропних