

non-volatile substances that cannot be analyzed by GC-MS. As a result of the performed researches a methods for the criminalistic research of microquantities of certain narcotic drugs (heroin, morphine, opium, methamphetamine, cocaine, etc.), psychotropic substances (clonidine, bromazepam, ketazolam, trihexyphenidyl, methaqualone, barbital, etc.), precursors (pseudoephedrine, ephedrine) and a poison such as scopolamine using GC-MS and LC-MS.

Keywords: controlled substances, narcotic, opium alkaloids, chromatography-mass spectrometry, high performance liquid chromatography with mass spectrometric detector.

DOI: <https://doi.org/10.32353/khrife.2018.39>

УДК 343.983.4

А. Г. Товмасын, эксперт отдела Национального бюро экспертиз Республики Армения

E-mail: annatovmasyan.1987@mail.ru,

М. В. Хачатрян, эксперт отдела Национального бюро экспертиз Республики Армения, кандидат химических наук,

А. С. Галстян, эксперт отдела Национального бюро экспертиз Республики Армения,

А. Л. Навасардян, эксперт отдела Национального бюро экспертиз Республики Армения, кандидат биологических наук

ВАЛИДАЦИЯ ГАЗО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО И УФ-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БУПРЕНОРФИНА В СООТВЕТСТВИИ С ТРЕБОВАНИЯМИ СТАНДАРТА ИСО/МЭК 17025:2005

Приведены результаты количественного расчета и построения калибровочных кривых наркотических средств, содержащих бупренорфин. Выполнена валидация методов газовой хроматографии и УФ-спектрометрии в соответствии с требованиями международного стандарта ИСО/МЭК 17025:2005 со следующими параметрами: особенность (специфичность), линейность, точность, стабильность и воспроизводимость. Показано, что практическая их реализация обеспечивает достоверное выполнение количественного определения бупренорфина.

Ключевые слова: бупренорфин, калибровочные кривые, валидация метода, наркотические средства, газовая хроматография, УФ-спектрометрия, длина волны, оптическая плотность, линейность.

В отделе физико-технических и химических исследований Национального бюро экспертиз Республики Армения, основанного в 2004 г., с целью

реализации армяно-американского межправительственного соглашения по контролю за незаконным оборотом наркотических средств в Республике Армения, накоплен значительный опыт по проведению экспертных исследований наркотических средств (НС), психотропных веществ (ПВ), прекурсоров (П), лекарственных средств (ЛС), сильнодействующих и ядовитых веществ (СДЯВ). При этом судебно-экспертные исследования, осуществляемые в рамках криминалистических экспертиз, преследуют выполнение следующих обязательных основных задач: обнаружение следов НС, ПВ, П, ЛС и СДЯВ на различных объектах-носителях, установление общей групповой принадлежности однородных по признакам сырья, технологии его переработки, условиям хранения и т. д., отождествление конкретных масс приведенных химических соединений по отдельным от них частям и т. п.

В последнее время при выполнении криминалистических исследований участились случаи представления на экспертизу наркотических средств, содержащих компонент бупренорфин, имеющего брутто-формулу $C_{29}H_{41}NO_4$ и систематическое наименование 5-альфа,7-альфа(S)-17-(циклопропилметил)-альфа-(1,1-диметилэтил-4,5-эпокси-18,19-дигидро-3-гидрокси-6-метокси-альфа-метил-6,14-этенморфин-7-метанол. При проведении количественных расчетов обнаруженных наркотических средств в исследуемых объектах, представляемых на экспертизу, для получения более точных и достоверных данных, в частности по бупренорфину, являющемуся частичным агонистом опиоидных рецепторов и обладающему обезболивающими свойствами, выполнены исследования, позволившие провести процедуру валидации газ-хроматографического и УФ-спектрометрического методов количественного определения бупренорфина¹.

В экспериментальных исследованиях при выполнении исследовательских работ использованы также: стандарт гидрохлорид бупренорфина (Batch: 3858-0292-30(B) (Reckitt and Coleman), метилстеарат (SIGMA-ALDRICH; CAS 112-61-8), метанол (SIGMA-ALDRICH; CAS 67-56-1), этанол (SIGMA-ALDRICH; CAS 64-17-5), хлороформ (SIGMA-ALDRICH; CAS 67-66-3), соляная кислота (SIGMA-ALDRICH; CAS 7647-01-0), вода двойной дистилляции (бидистиллат).

Количественное определение бупренорфина методом газовой хроматографии. Исследования выполнены с помощью газового хроматографа модели HP-6890 при соблюдении следующих условий: детектор – пламенно-ионизационный; колонка – стеклянная, капиллярная, 10 м; жидкая фаза – силексан; газ-носитель – водород; температура испарителя – 250 °С; температура детектора – 250 °С; температура камеры – 75–280 °С (25 °С/с)².

¹ *Машковский М. Д.* Лекарственные средства. 15-е изд. Москва : Новая волна, 2010. 1206 с.; *Validation of Analytical Procedures: Guide to Good Manufacturing Practise for Medical Products. Part 2. PIC/S, January 2013.* 50 с.; *Tovmasyan A. G., Gharajyan K. S.* Diazepam, lorazepam and buprenorphine-containing objects' validation method in accordance with ISO/IEC 17025:2005 standard requirements to materiological expertise of the objects: scientific report in *Proceedings Chemical and Environmental Technologies Journal*. Vol. 90. No 2. 2017. Pp. 24–30.

² *Еремин С. К., Изотов Б. Н., Веселовская Н. В.* Анализ наркотических средств. Москва : Мысль, 1993. 259 с.; *Guidelines on Representative Drug Sampling, in cooperation*

В качестве внутреннего стандарта использован этаноловый или метаноловый раствор метилстеарата с концентрацией 1 мг/мл.

Для количественного определения бупренорфина и последующего построения калибровочных кривых были произведены вколы в инжектор газового хроматографа заранее приготовленных, концентрированных рабочих растворов в объеме 1 мкл. Для каждой концентрации были произведены по 3–4 вкола, обозначенные соответственно: BUPR 1/1.D, BUPR 1/2.D и BUPR 1/3.D¹.

Результаты исследований приведены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты газ-хроматографического исследования бупренорфина

Наименование образца	Время удержания, мин	Концентрация растворов, мг/м	Площадь пиков, рА·с
BUPR1/1.D	10,721	10	4227,3
BUPR1/2.D	10,7	10	3359,3
BUPR1/3.D	10,713	10	3660,7
BUPR2/1.D	10,683	5	1906,6
BUPR2/2.D	10,687	5	1947,7
BUPR2/3.D	10,679	5	1841,6
BUPR3/1.D	10,645	2,5	1115,7
BUPR3/2.D	10,642	2,5	848,3
BUPR3/3.D	10,656	2,5	766,6
BUPR3/4.D	10,664	2,5	932,5
BUPR4/1.D	10,643	1,25	493,5
BUPR4/2.D	10,641	1,25	391,1
BUPR4/3.D	10,646	1,25	355,8
BUPR4/4.D	10,649	1,25	354,3
BUPR5/1.D	10,648	0,625	168,2
BUPR5/2.D	10,648	0,625	171,9
BUPR5/3.D	10,655	0,625	172,7
BUPR5/4.D	10,651	0,625	172,2

with the Drugs Working Group of the European Network of Forensic Science Institutes. United Nations. New York, 2009. 76 p.

¹ Guidelines on Sampling of Illicit Drugs for Quantitative Analysis, ENFSI Drugs Working Group. Ref. Code: DWG-GQS-002, April 14th, 2014; Руководство для предприятий фармацевтической промышленности (метод. рекоменд.). Части I–III. Москва : Спорт и Культура – 2000, 2007; Agilent Technologies 6890, Gas Chromatograph, Control. 03-914947-32: Rev. 10.

Концентрації бупренорфина были перепроверены как минимум трехкратно, а расчетные значения площадей пиков были усреднены. На рис. 1 приведена калибровочная зависимость площади пиков от концентраций исследуемого объекта.

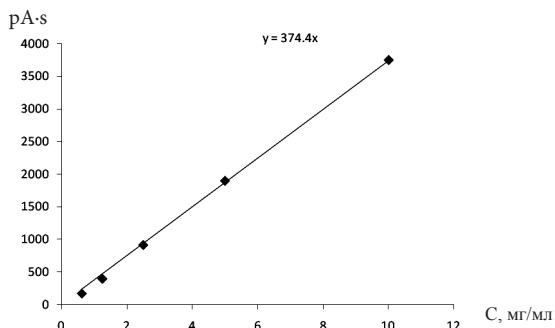


Рис. 1. Калибровочная кривая для бупренорфина

Полученная линейная зависимость ($y = kx$) позволяет рассчитать коэффициент k , используемый в дальнейшем при вычислении значения неопределенности измерений. Так, обработка построенной калибровочной кривой позволила рассчитать коэффициент k для бупренорфина, который составил 374,4.

Таким образом, при количественном расчете экспериментальных значений исследуемых таблеток, жидкостей, в которых содержится бупренорфин, при проведении экспертных исследований, предлагается руководствоваться следующей методологией: от исследуемых таблеток отбирается соответствующая аликвота образца, а при исследовании жидкостей – 1 мл с досушиванием до стабильного сухого остатка. Из отобранных образцов с помощью химически чистых растворителей (метанол, этанол, хлороформ, гексан и т. п.) готовятся экстракты в объеме 1 мл, к которым затем добавляется равное количество метанольного раствора метилстеарата с концентраций 1 мг/мл. Вслед за этим каждый образец подвергается трехкратному газ-хроматографическому анализу, а полученные усредненные значения площадей пиков делятся на заранее вычисленные значения коэффициентов k . Таким образом, вычисленные значения представляют собой концентрации рассматриваемых компонентов, содержащихся в исследуемых экспериментальных образцах, массы которых были заранее известны. На заключительном этапе проводится расчет концентрации для изначально исследуемого объекта в целом. Полученная концентрация соответствует количеству исследуемого объекта в граммах¹.

¹ Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. EURACHEM/CITAC Guide CG4, 133 p.; A Guide on Measurement Uncertainty in Chemical and Microbiological

Процедура валидации разработанного метода выполнена в соответствии со следующими параметрами: особенность (Specificity), линейность (Linearity), точность (Accuracy), стабильность (Repeatability) и воспроизводимость (Intermediate precision).

1. Особенность (специфичность) показывает, что исследуемый компонент бупренорфина имеет определенное время удержания (Retention times), и данные значения отличаются от времени удержания компонентов растворителя и других веществ (табл. 1)¹.

2. Линейность показывает, что площади соответствующих пиков, полученных в результате вколов рабочих стандартных растворов, находятся в линейной зависимости от концентрации этих растворов. Исследования были проведены с использованием пяти концентраций рабочих стандартных растворов. Отметим, что корреляция считается линейной при коэффициенте $r^2 \geq 0,99$. При исследовании пяти концентрационных точек бупренорфина коэффициент корреляции составляет $r^2 = 0,9950$ (рис. 1)².

3. Точность показывает, что разработанным методом корректно определяются концентрации исследуемых растворов. Исследования проведены для трех стандартных растворов трех разных концентраций с трехкратным повторением вколов для каждой концентрации с последующим выведением среднего арифметического значения полученных величин³.

4. Стабильность показывает, что хроматографическая система устойчива, и при повторных исследованиях одного и того же образца была достигнута воспроизводимость результатов.

5. Воспроизводимость показывает, что при проведении исследований на следующий день или исследований, выполненных другим экспертом, обеспечивается воспроизводимость измерений.

Для подтверждения достоверности количественных определений были выполнены следующие исследования. Последовательно проведены вколы рабочего стандартного раствора бупренорфина трех различных концентраций. С каждым из приготовленных образцов выполнены трехкратные газ-хроматографические исследования с получением всех перечисленных пяти параметров. Полученные результаты исследований и расчеты по ним позволили выполнять количественные расчеты (определения) соответствующих компонентов в исследуемых образцах, представляемых на экспертизу, на основе описанного метода с использованием полученных значений неопределенности измерений в соответствии с требованиями международного стандарта ISO/IEC 17025:2005.

Analysis: Technical Guide 2 Accredited Laboratory Sac-singlas. 104 p.; Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories. 2003-5. 41 p.

¹ Еремин С. К., Изотов Б. Н., Веселовская Н. В. Указ. соч.; Validation of Analytical Procedures: Guide to Good Manufacturing Practise for Medical Products. Part 2. PIC/S, January 2013. 50 с.; Agilent Technologies 6890, Gas Chromatograph, Control. 03-914947-32: Rev. 10.

² Там же.

³ Там же.

Количественное определение бупренорфина УФ-спектрометрическим методом. УФ-спектрометрия представляет собой простой и быстрый метод количественного анализа химических соединений¹. УФ-спектроскопией можно применять к любым контролируемым веществам при наличии стандартных образцов и при отсутствии препятствующих определению посторонних компонентов. Как правило, определению анализируемого вещества не будет препятствовать тот или иной компонент, если разница между длинами волн, при которых наблюдается максимальное поглощение анализируемых веществ, составляет не менее 20 нм². Количественное определение химических соединений, как правило, проводят в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера³.

Исследования выполнены с помощью спектрометра модели Agilent Cary 60 в диапазоне длин волн от 800 до 200 нм на полном спектре с использованием кварцевых кювет и толщины поглощающего слоя 10 мл (Part-No. 6610000800, Quartz Cell 10mm, 3500 µl 2/p). Отметим, что с помощью спектрометра модели Agilent Cary 60 можно быстро и с высокой точностью выполнить качественный и количественный анализ бупренорфина, содержащегося в составе исследуемых объектов, без использования дорогостоящих реагентов.

Для количественного определения и построения калибровочных кривых для бупренорфина выполнена регистрация УФ-спектров заранее приготовленных, концентрированных рабочих водных растворов (подкисленных 2–3 каплями 0,1N раствора соляной кислоты) при максимальном значении поглощения бупренорфина соответствующего $\lambda_{\max} = 288$ нм.

Измерены следующие концентрации бупренорфина: 0,016, 0,035, 0,08, 0,12, 0,16 мг/мл. Полученные значения оптической плотности при $\lambda_{\max} = 288$ нм приведены в табл. 2.

Полученная линейная зависимость ($y = kx$) позволила рассчитать коэффициент k для бупренорфина, который составил 5,489.

Результаты исследования обеспечивают возможность проведения количественных определений бупренорфина с использованием УФ-спектрофотометрического метода анализа.

На основе полученных результатов была построена калибровочная кривая бупренорфина (рис. 2).

¹ Количественное определение некоторых наркотических средств методами газовой жидкостной хроматографии и УФ-спектроскопии : метод. рекомендации / В. И. Сорокин, И. Г. Алексеев, Т. Б. Кимстач и др. Москва : Эксперт-криминалист. центр МВД России, 2000; Бушуев Е. С., Бабаханян Р. В., Соловьева Т. Л. Применение спектрофотометрии в химико-токсикологическом анализе. СПб. : ББМ, 2006. С. 25; Саканян Е. И., Бушуев Е. С., Шебатин Р. В. Анализ неизвестных лекарственных веществ с применением химических и физико-химических методов. СПб. : СПХФА, 2005. С. 88.

² Бушуев Е. С., Бабаханян Р. В., Соловьева Т. Л. Указ. соч.

³ Петрухин О. М. (ред.) Практикум по физико-химическим методам анализа. Москва, 1987. С. 56.

Таблиця 2

Результаты УФ-спектрометрического исследования бупренорфина

Концентрация [C], г/мл	Оптическая плотность [D]
0	0
0,016	0,122
0,035	0,218
0,08	0,422
0,12	0,641
0,16	0,891

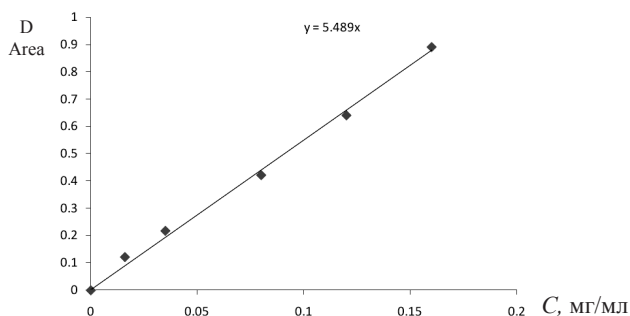


Рис. 2. Калибровочная кривая бупренорфина, подкисленного 0,1N раствором соляной кислоты

Исходя из представленных экспериментальных результатов и проведенных процедур валидации в судебно-экспертную практику отдела внедрены два метода анализа: газ-хроматографический и УФ-спектрофотометрический, обеспечивающие в соответствии с требованиями международного стандарта ISO/IEC 17025:2005 достоверное выполнение количественного определения бупренорфина.

**ВАЛІДАЦІЯ ГАЗО-ХРОМАТОГРАФІЧНОГО
ТА УФ-СПЕКТРОМЕТРИЧНОГО МЕТОДІВ
КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ БУПРЕНОРФІНУ
ВІДПОВІДНО ДО ВИМОГ СТАНДАРТУ ІСО/МЕК 17025:2005**

Товмасян Г. Г., Хачатрян М. В., Галстян А. С., Навасардян А. Л.

Розглянута валідація газо-хроматографічного й УФ-спектрометричного методів кількісного визначення бупренорфіну, що є частковим агоністом опіоїдних рецепторів і володіє знеболюючими властивостями, відповідно до вимог стандарту

ISO/МЕК 17025:2005. Звернено увагу на те, що при проведенні кількісних розрахунків виявлених наркотичних засобів, психотропних речовин, прекурсорів, лікарських засобів, сильнотоксичних і отруйних речовин у досліджуваних об'єктах, наданих на експертизу, для отримання більш точних і достовірних даних, виникає необхідність їх достовірного кількісного визначення відповідно до вимог стандарту ISO/МЕК 17025:2005. Як приклад наведено результати кількісного розрахунку і побудови калібрувальних кривих наркотичних засобів, що містять бупренорфін. Проведена валідація методів газової хроматографії й УФ-спектрометрії відповідно до вимог міжнародного стандарту ISO/МЕК 17025:2005. Валідація розроблених методів виконана згідно з такими параметрами: особливність (специфічність), лінійність, точність, стабільність і відтворюваність. Наведено калібрувальні залежності, показана їх лінійність, що дозволяє розрахувати коефіцієнт k , використовуваний надалі при обчисленні значення невизначеності вимірів. Отримані результати досліджень і розрахунки по них дозволили виконувати кількісні розрахунки (визначення) відповідних компонентів у досліджуваних зразках, що надаються на експертизу, на основі розробленої у відділі фізико-технічних і хімічних досліджень Національного бюро експертиз Республіки Вірменія методології, з використанням отриманих значень невизначеності вимірів відповідно до вимог міжнародного стандарту ISO/МЕК 17025:2005. Показано, що практична їх реалізація забезпечує достовірне виконання кількісного визначення бупренорфіну. Таким чином, відштовхуючись від експериментальних результатів і проведених процедур валідації, у судово-експертну практику відділу впроваджено два методи аналізу: газо-хроматографічний і УФ-спектрофотометричний, що забезпечують відповідно до вимог міжнародного стандарту ISO/МЕК 17025:2005 достовірне виконання кількісного визначення бупренорфіну.

Ключові слова: бупренорфін, калібрувальні криві, валідація методу, наркотичні засоби, газова хроматографія, УФ-спектрометрія, довжина хвилі, оптична щільність, лінійність.

VALIDATION OF GAS CHROMATOGRAPHIC AND UV SPECTROMETRIC METHODS OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF BUPRENORPHINE ACCORDING TO REQUIREMENTS OF ISO/IEC 17025:2005 STANDARD

Tovmasyan A. G., Khachatryan M. V., Galstyan A. S., Navasardyan A. L.

The article is considered to the validation of gas-chromatographic and UV spectrometric methods for the quantitative determination of buprenorphine, which is a partial agonist of opioid receptors and having analgesic properties, according to requirements of ISO/IEC 17025:2005. Authors highlight the fact that during the quantitative calculations of the detected narcotic, psychotropic substances, precursors, drugs, virulent and drastic toxic substances in investigated objects submitted for examination, in order to obtain more accurate and reliable data, there is a need for their reliable quantitative determination in accordance with the requirements of ISO/IEC 17025:2005.

Results of quantitative calculation and constructing of calibration curves of narcotic containing buprenorphine are presented as an example. The validation of gas chromatography and UV spectrometry methods was carried according to requirements of the international standard ISO/IEC 17025:2005. Validation of developed methods is executed in accordance to following parameters: peculiarity (specificity), linearity, accuracy, stability and reproducibility. This article presents calibration dependencies, their linearity is rep-

resented, which makes possible to calculate the coefficient k , used in future in calculating the value of uncertainty measurements.

Obtained results of the research and calculations on made allowed to perform quantitative calculations (determinations) of relevant components in the submitted samples for examination on the basis of the methodology developed in the Department of Physical, Technical and Chemical Research of the National Bureau of Expertise of the Republic of Armenia using the obtained values of measurement uncertainty according to requirements of the international standard ISO/IEC 17025:2005. Their practical implementation ensures reliable performance of quantitative determination of buprenorphine are demonstrated. Thus, based on experimental results and validation procedures, forensic expert practice department introduced two methods of analysis: gas-chromatographic and UV Spectrophotometric, providing reliable execution of quantitative determination of buprenorphine according to requirements of the international standard ISO/IEC 17025:2005.

Keywords: buprenorphine, calibration curves, method validation, narcotics, gas chromatography, UV spectrometry, wavelength, optical density, linearity.