

ІЗОЛЮВАННЯ ГІДАЗЕПАМУ ТА ЙОГО МЕТАБОЛІТІВ МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ

Ключові слова: гідазепам, бензодіазепіни, метаболіти, твердофазна екстракція, ступінь екстракції

Гідазепам як представник групи бензодіазепіну, незважаючи на значно менший седативний ефект [1], є об'єктом немедичного використання полізалежними наркоманами, алкоголіками, а також, в комбінації з іншими препаратами і алкоголем, його застосовують як засіб кримінального впливу на особистість людини. Тому під час будь-якого токсикологічного аналізу скринінг на бензодіазепіни є обов'язковим елементом. Головною особливістю гідазепаму як об'єкта токсикологічного дослідження є його інтенсивний метаболізм [1]. Як наслідок, в організмі присутні головним чином тільки його метаболіти. У крові та паренхіматозних органах лише N¹-дезалкілгідазепам (ДАГ), а в сечі – карбоксиметилгідазепам (КМГ), ДАГ, нативний гідазепам та 3-гідрокси-N¹-дезалкілгідазепам (ГДАГ) [2].

Одним із ключових факторів, який обмежує виявлення аналітів, є ізолювання їх із матриці. Серед методів ізолювання як альтернативний метод, особливо у разі дослідження біологічних рідин із подальшим інструментальним виявленням, в практиці аналітичної токсикології використовують твердофазну екстракцію (ТФЕ) на різноманітних сорбентах. Головними перевагами ТФЕ перед класичною рідино-рідинної екстракцією (РЕ) є використання значно менших об'ємів розчинників, можливість швидкого переходу від водних розчинів до незмішуваних із водою розчинників і навпаки та відсутність ефекту утворення емульсій. До того ж, ТФЕ властиві доволі високі ступені екстракції (понад 90%), а сам метод легко може бути автоматизовано, що дає змогу виконувати масові дослідження [3, 4]. Беручи до уваги поступове збільшення використання вітчизняними лабораторіями в своїй практиці методу ТФЕ, а також те, що поведінку гідазепаму та його метаболітів раніше не досліджували в умовах ТФЕ, метою роботи стало дослідити ефективність існуючих процедур ТФЕ відносно гідазепаму та його метаболітів.

Матеріали та методи дослідження

У дослідженні використовували колонки для ТФЕ Bond Elut Certify об'ємом 3 мл, кількість сорбенту в яких становить 130 мг (Agilent Technologies, США). Сорбент в цих колонках характеризується змішаним механізмом утримання аналітів – катіонообмінним та гідрофобним. Відповідно сполуки, які можуть іонізуватися по типу основ (як правило ті, що містять аміногрупи), утримуються як за рахунок іонного зв'язку з сульфогрупами сорбенту, так і завдяки гідрофобній взаємодії. Нейтральні сполуки та сполуки аніонної природи утримуються сорбентом лише за рахунок гідрофобних сил.

Усі допоміжні та буферні розчини готували згідно з [5]. Проби крові готували додаванням до 1 мл цільної крові, яка не містить метаболітів гідазепаму, 10 мкл метанольного розчину ДАГ із концентрацією 100 мкл/мл. Проби сечі готували з гідролізату після ферментативного гідролізу сечі, що не містить гідазепаму та його метаболітів, виготовленому згідно з [4]. До 1 мл гідролізату додавали 20 мкл метанольного розчину суміші гідазепаму, КМГ, ДАГ та ГДАГ із вмістом кожного компоненту по

100 мкг/мл. Як контрольний розчин використовували, відповідно для крові та сечі, 10 та 20 мкл розчинів аналітів, які досліджували без процедури екстракції. Перед внесенням у колонку для ТФЕ 1 мл відповідного об'єкту попередньо розводили 3 мл 0,1 М фосфатного буферного розчину (рН = 6,0).

Кінцеві екстракти та контрольні розчини досліджували методом двомірної хромато-мас-спектрометрії [6] на хромато-мас-спектрометрі Agilent 6890N/5973N/FID (Agilent Technologies, США) із мікропотоким перемикачем Діна. Відсоток екстракції визначали як відношення площ хроматографічних піків досліджуваних амінобензофенонів в екстрактах до площ відповідних хроматографічних піків контрольного розчину.

Серед методів ТФЕ, відповідно до екстрагуючих колонок, було використано чотири процедури, дві з яких розроблено для скринінгу на невідому речовину (ТФЕ-процедури № 1 та № 2), а інші дві для скринінгу безпосередньо на бензо-дізепіні відповідно в сечі (ТФЕ-процедура № 3) та крові (ТФЕ-процедура № 4). Причому всі чотири ТФЕ-процедури застосовували для екстракції як крові, так і сечі.

ТФЕ-процедура № 1 [4]. Розбавлений буферним розчином об'єкт переносили в промиту 2 мл метанолу та 2 мл 0,1 М фосфатного буферного розчину (рН = 6,0) колонку. Після поглинання проби в колонці, колонку послідовно промивали 1 мл 0,1 М фосфатного буферного розчину (рН = 6,0), 1 мл суміші 0,1 М фосфатного буферного розчину (рН = 6,0) та метанолу (8:2), потім 1 мл 1 М розчину оцтової кислоти. Промиту колонку послідовно сушили 5 хв повітрям, краплі вологи з внутрішньої поверхні колонки видаляли фільтрувальним папером, промивали 1 мл гексану та знову сушили 5 хв повітрям. Після сушіння спочатку аналіти елюювали з колонки 1,5 мл суміші гексан–етилацетат (8:2) та збирали елюат № 1, а потім – сумішшю дихлорметан–і-пропанол–25%-й розчин амоніаку (8:2:0,2), збираючи елюат № 2.

ТФЕ-процедура № 2 [5]. Підготовку колонки перед екстракцією здійснювали як у процедурі № 1. Після поглинання проби в колонці, колонку послідовно промивали 1 мл дистильованої води, 0,5 мл 0,01 М розчину оцтової кислоти, сушили 4 хв повітрям, вносили в колонку 50 мкл метанолу та знову сушили повітрям 1 хв. Після сушіння аналіти спочатку елюювали з колонки 4 мл суміші ацетон–хлороформ (1:1) та збирали елюат № 1, а потім – сумішшю етилацетат–25%-й розчин амоніаку (98:2), збираючи елюат № 2.

ТФЕ-процедура № 3 [5]. У промиту послідовно 2 мл метанолу, 2 мл дистильовані води та 1 мл 0,1 М фосфатного буферного розчину (рН = 6,0) колонку вносили відповідну пробу. Після поглинання проби колонку послідовно промивали 2 мл дистильованої води, 2 мл 20%-го розчину ацетонітрилу в 0,1 М фосфатному буферному розчині (рН = 6,0), сушили повітрям 5 хв та промивали 2 мл гексану. Далі аналіти елюювали з колонки 2 мл суміші дихлорметан–і-пропанол–25%-й розчин амоніаку (7,8:2:0,2).

ТФЕ-процедура № 4 [5]. Підготовка колонки аналогічна тій, що описана в процедурі № 3. Після поглинання проби в колонці, колонку послідовно промивали 3 мл дистильованої води, 1 мл 1 М розчину оцтової кислоти, 3 мл метанолу та сушили повітрям 5 хв. Далі аналіти елюювали з колонки також 2 мл суміші дихлорметан–і-пропанол–25%-й розчин амоніаку (7,8:2:0,2).

Зібрані елюати упарювали, дериватизували та досліджували. Кінцеві екстракти становили 100 мкл.

Результати дослідження та обговорення

Результати екстракції за допомогою досліджених ТФЕ-процедур подано в табл. 1 та 2.

**Ефективність ізолювання гідазепаму та його метаболітів методом
ТФЕ із сечі ($X_{cp} \pm \sigma$, %)**

Речовина	ТФЕ-процедура					
	№ 1		№ 2		№ 3	№ 4
	елюат		елюат			
	№ 1	№ 2	№ 1	№ 2		
Гідазепам	–	74 ± 4	18 ± 6	52 ± 5	51 ± 3	72 ± 3
КМГ	–	94 ± 3	92 ± 2	–	61 ± 5	98 ± 3
ДАГ	–	98 ± 4	96 ± 3	–	97 ± 4	96 ± 3
ГДАГ	–	96 ± 4	97 ± 4	–	96 ± 3	96 ± 4

Примітка. Тут і в табл. 2: $n = 5$, $P = 95\%$.

**Ефективність ізолювання гідазепаму та його метаболітів методом
ТФЕ із крові ($X_{cp} \pm \sigma$, %)**

Речовина	ТФЕ-процедура					
	№ 1		№ 2		№ 3	№ 4
	елюат		елюат			
	№ 1	№ 2	№ 1	№ 2		
ДАГ	–	93 ± 4	96 ± 6	–	94 ± 5	96 ± 5

Загалом отримані результати демонструють досить високі екстракційні властивості методу ТФЕ. Задовільні результати одержано лише для гідазепаму та КМГ при використанні процедури № 3. Із метою з'ясування на якому саме етапі відбуваються втрати, було додатково проведено хромато-мас-спектрометричне дослідження окремо кожного елюату після кожного етапу промивання колонки. Результати подано в табл. 3

Походження втрат ТФЕ-процедури № 3

Етапи промивання колонки	Гідазепам	КМГ
1 мл дистильованої води	–	–
1 мл дистильованої води	–	–
1 мл 20%-го ацетонітрилу в 0,1 М буферному розчині	–	8
1 мл 20%-го ацетонітрилу в 0,1 М буферному розчині	–	33
1 мл гексану	–	–
1 мл гексану	–	–

Аналіз даних табл. № 3 свідчить, що 20%-й розчин ацетонітрилу в буферному розчині достатньо сильний елюент, який разом із компонентами матриці здатен десорбувати КМГ. Власне така ситуація може бути зумовлена гідрофільними властивостями самого КМГ. Щодо гідазепаму, то відсутність його в досліджених елюатах свідчить про значне зв'язування останнього із сорбентом в досліджуваних умовах. Таким чином, процедура ТФЕ № 3, рекомендована виробником для дослідження саме сечі, відносно гідазепаму та його метаболітів, насамперед КМГ, є малоприматною. Екстракція за допомогою процедури № 3 ДАГ із крові теж можлива. Але, незважаючи на високий ступінь екстракції, комбінація розчинників для промивання колонки більш ефективна для видалення гідрофільних компонентів сечі, ніж ліпофільних крові, які, залишаючись у колонці, потім вимиваються разом

з аналітами, забруднюючи їх. У разі процедури № 4, послідовне промивання дистильованою водою, розчином оцтової кислоти та метанолом достатньо ефективно видаляє як ліпофільні, так і гідрофільні коекстрактивні речовини. Крім того, розчином оцтової кислоти досягається іонізація аналітів і додаткове зв'язування їх із сорбентом за рахунок іонних сил, що суттєво при подальшому промиванні колонки метанолом. У цілому, ТФЕ-процедура № 4 достатньо ефективна як для крові, так і для сечі.

Поведінка гідазепаму та його метаболітів при використанні ТФЕ-скринінгу на невідому речовину достатньо зрозумілі та зумовлені властивостями самих речовин. У разі використання ТФЕ-процедури № 1 промивання розчином оцтової кислоти аналогічно із процедурою № 4 спричинює іонізацію та іонне зв'язування аналітів. Таким чином, при отриманні елюату № 1 досліджувані речовини міцно зв'язані зі сорбентом. Подальше використання підлученої суміші органічних розчинників деіонізує досліджувані речовини та видаляє їх із сорбенту. Суттєво, що за цих умов амонійна сіль КМГ достатньо розчинна в елюенті. Аналогічна ситуація й у разі використання ТФЕ-процедури № 2. Але використання 0,01 М розчину оцтової кислоти виявляється недостатнім для суттєвої зміни рН та іонізації метаболітів, окрім гідазепаму, який іонізується не повною мірою. Як наслідок, метаболіти опиняються в елюаті № 1, а сам гідазепам в обох елюатах.

В и с н о в к и

1. Ступінь екстракції КМГ, ДАГ та ГДАГ всіма дослідженими ТФЕ-процедурами становить 92–98%, ефективність ізолювання самого гідазепаму становить 51–74%.

2. Присутність ацетонітрилу в сумішах для промивання ТФЕ-колонок призводить до зменшення ступеня екстракції КМГ, і тому його не мають використовувати під час екстракції об'єктів, які містять цей метаболіт гідазепаму.

3. Попереднє промивання ТФЕ-сорбенту із поглиненими гідазепамом та його метаболітами 1 М розчином оцтової кислоти дає змогу утримувати їх у колонці при подальшому видаленні ліпофільних коекстрактивних речовин органічними розчинниками.

4. У результаті дослідження показано, що метод ТФЕ достатньо ефективний для використання в практиці аналітичної токсикології для дослідження гідазепаму та його метаболітів.

Список використаної літератури

1. Андронати С. А., Воронина Т. А. и др. Гидазепам. – К.: Наук. думка, 1992. – 200 с.
2. Чубенко А. В., Савченко М. А. Разработка и валидация метода определения гидазепам в биологическом материале методом хромато-масс-спектрометрии // Вестн. Казахского нац. мед. ун-та. – 2015. – № 2. – С 504–507.
3. Forensic and Clinical Applications of Solid Phase Extraction / Ed. by M. J. Telepchak. – Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2004 – 370 p.
4. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons / Ed. by A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop. 4th ed. – London: Pharmaceutical Press, 2011. – 2581 p.
5. Agilent bond elut certify and certify II methods manual [Electronic resource] / Agilent Technologies Inc. – 2014. – Publication number 5991–4939EN. – Way of access: URL: <http://www.agilent.com/cs/library/brochures/Bond%20Elut%20Certify%20MethodsManual.pdf>. – Title from the screen.
6. Harry Preston. «Capillary flow technology for GC/MS: a simple tee configuration for analysis at trace concentrations with rapid backflushing for matrix elimination», Agilent Technologies publication 5989-8664EN.

Надійшла до редакції 1 квітня 2016 року.

М. А. Савченко

Харьковская медицинская академия последипломного образования

ИЗОЛИРОВАНИЕ ГИДАЗЕПАМА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ

Ключевые слова: гидазепам, бензодиазепины, метаболиты, твердофазная экстракция, степень экстракции

А Н Н О Т А Ц И Я

Как представитель производных бензодиазепина, гидазепам является объектом немедицинского использования, что, в свою очередь, обуславливает интерес к нему как объекту токсикологического исследования. Одним из ключевых этапов анализа аналита является изолирование его из биобъекта исследования, а в случае гидазепама такими аналитами являются его метаболиты.

Одним из методов изолирования, использующихся в аналитической токсикологии, является метод твердофазной экстракции, имеющий преимущество по сравнению с жидкостной экстракцией. Однако работы по изучению эффективности метода твердофазной экстракции для изолирования гидазепама и его метаболитов в настоящее время отсутствуют. Таким образом, цель настоящей работы – изучить возможность применения метода твердофазной экстракции в практике аналитической токсикологии.

В работе были использованы ТФЭ-колонки Bond Elut Certify объемом 3 мл, содержащие 130 мг сорбента (Agilent Technologies, США). Изучению были подвергнуты ТФЭ-процедуры, оптимизированные под указанные ТФЭ-колонки для экстракции из крови и мочи. Две процедуры разработаны для экстракции в случае общего скрининга на неизвестный препарат, и две – для скрининга бензодиазепинов.

В результате исследования установлено, что степень экстракции основных метаболитов гидазепама составляет 92–98%, а самого гидазепама 51–74%. Также установлено, что использование ацетонитрила в растворах для удаления коэкстрактивных веществ значительно снижает степень экстракции одного из метаболитов. Вместе с тем, применение 1 М раствора уксусной кислоты способствует удержанию гидазепама и метаболитов на колонке в процессе удаления липофильных примесей органическими растворителями. Показано положение гидазепама и его метаболитов в схеме общего токсикологического скрининга на неизвестный препарат в случае использования двух процедур ТФЭ-скрининга.

М. А. Savchenko

Kharkiv Medical Academy of Post-graduate Education

ISOLATION GIDAZEPAM AND ITS METABOLITES BY SOLID-PHASE EXTRACTION

Key words: gidazepam, benzodiazepines, metabolites, extraction, solid-phase extraction, degree of extraction

А В С Т Р А К Т

Gidazepam as benzodiazepine derivative is drugs of abuse and is object of toxicological research. The first phases of analysis of analite is its insulating from biological objects. In a case of gidazepam such analites is its metabolites.

One of insulating method which used in analytical toxicology is the method of solid-phase extraction (SPE). This method have advantage in comparison with is liquid extraction. However papers about studying of insulating efficiency gidazepam and its metabolites of SPE are absent now. Thus the purpose of the this paper is a study of applications of SPE in analytical toxicology.

For work SPE columns Bond Elut Certify have been used (volume 3 mL, amount of a sorbent 130 mg), production of Agilent Technologies. The SPE protocols which studying have been optimised under these columns for extraction from blood and urine. Two procedures are developed for extraction in case of the general screening of an unknown drug, and two for screening of benzodiazepines.

Showed that degree of extraction of the basic gidazepam's metabolites compounds 92–98%, and for gidazepam 51–74%. Also it is positioned that acetonitrile in solutions for removal coextractive substance considerably depresses degree of extraction one of gidazeam's metabolite. At the same time application of 1 M acetic acid promotes retention of gidazepam and its metabolites on a SPE column in the course of removal lipophilic impurities by organic solvents. Position of gidazepam and its metabolites in the schema of the general screening of an unknown drug in both SPE screening procedures is showed.

Електронна адреса для листування з автором: taxnecrochemist@gmail.com