

Міністерство охорони здоров'я України
Запорізький державний медичний університет
Запорізьке обласне бюро судово-медичної експертизи

ПРАКТИЧНИЙ ПОСІБНИК ПО СКРИНІНГУ ЛІКАРСЬКИХ,
НАРКОТИЧНИХ РЕЧОВИН ТА ЇХ МЕТАБОЛІТІВ МЕТОДОМ
ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІИ З МАС-СЕЛЕКТИВНИМ ДЕТЕКТОРОМ

ЗАПОРІЖЖЯ

2015

Навчально-методичний посібник по скринінгу лікарських, наркотичних речовин та їх метаболітів методом газової хроматографії з мас-селективним детектором

Посібник підготовлений співробітниками кафедри токсикологічної та неорганічної хімії Запорізького медичного університета:

- д. фарм. н., проф. Панасенком О.І.;
- д. фарм. н., проф. Буряком В.П.;
- д. фарм. н., доц. Парченком В.В.;
- к. фарм. н., доц. Кремзером О.А.;
- к. фарм. н., доц. Мельником І.В.;
- к.фарм. н., ас. Сафоновим А.А.;
- к.фарм. н., ст. викладачем Щербиною Р.О.
- к. фарм. н., ст. викладачем Гоцулею А.С.;
- к. фарм. н., ст. викладачем Постол Н.А.,
- к.фарм. н., ст. викладачем Кулішом С.Н.,
- ас.Саліоновим В.О.

та співробітниками Запорізького обласного бюро судово-медичної експертизи

- начальником комунальної установи «Запорізьке обласне бюро судово-медичної експертизи» Запорізької обласної ради Ксензовим Євгенієм Олександровичем
- завідувачем відділення судово-медичної токсикології Уткіної Оксаною Олександрівною

Затверджено на засіданні Центральної методичної ради ЗДМУ, протокол № 6 від 20.05.2015 року.

МЕТА ВИВЧЕННЯ НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ

Метою вивчення токсикологічної хімії (хіміко-токсикологічного аналізу) є підготовка фахівців, які повинні володіти знаннями та практичними навичками, що дозволило би їм організувати і проводити роботу з хіміко-токсикологічних досліджень у бюро судово-медичної експертизи, лабораторіях промислово-санітарного аналізу фармацевтичних підприємств, клінічних лабораторіях по визначенню лікарських речовин та їх метаболітів у біологічних рідинах, санітарно-епідеміологічних станціях.

Метою вивчення токсикологічної хімії є те, що на основі знань загальних та часткових принципів, закономірностей та сформувані у фахівця знання:

- визначати лікарські отрути, сполуки та їх метаболіти в біологічних рідинах і тканинах людини і тварин;
- проводити загальні та цілеспрямовані судово-хімічні дослідження речових доказів (особливо біологічного походження);
- проводити експрес-аналіз з метою встановлення причин та ступеню тяжкості гострих отруєнь.

Для вироблення названих навичок, а також формування хіміко-експертного мислення у студентів велике значення мають лабораторні заняття, які повинні бути направлені на придбання наступних практичних навичок.

ФОРМИ КОНТРОЛЮ

1. Поточний контроль. Стандартизовані методи діагностики знань та навичок.
2. Підсумковий контроль (перелік питань, тестування, розв'язання ситуаційних завдань)

СИСТЕМА ОЦІНЮВАННЯ НАВЧАЛЬНОЇ ДІЯЛЬНОСТІ СТУДЕНТІВ ПРИ КРЕДИТНО-МОДУЛЬНІЙ СИСТЕМІ ОРГАНІЗАЦІЇ НАВЧАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ

При оцінюванні знань студентів надається перевага стандартизованим методам контролю: тестуванню, структурованим письмовим роботам, структурованому контролю практичних навичок в умовах, що наближаються до реальних.

Оцінка з дисципліни співпадає з оцінкою за модуль.

Оцінка за модуль визначається як сума оцінок поточної навчальної діяльності та оцінки підсумкового модульного контролю і виражається за 100 бальною шкалою.

Максимальна кількість балів, яку студент може набрати при вивченні кожного модуля, становить 100 балів, у тому числі за поточну навчальну діяльність - 60 балів, за результати підсумкового модульного контролю - 40 балів (60 та 40% відповідно).

Поточний контроль здійснюється на основі контролю поточних знань, практичних навичок і вмінь. **Він здійснюється на кожному**

практичному занятті відповідно конкретним цілям теми, під час індивідуальної роботи викладача зі студентами, особливо для тих тем, які студент опрацьовує самостійно і вони не входять до структури практичного заняття.

Форми поточного контролю:

- **теоретичних знань** - тестові завдання, індивідуальне опитування, співбесіда;
- **практичних навичок і вмінь** - рішення типових і ситуаційних задач

Підсумковий контроль здійснюється на основі контролю теоретичних знань, практичних навичок і вмінь.

Форми підсумкового контролю:

- **теоретичних знань** система запитань, тестові завдання
- **практичних навичок і вмінь** - рішення типових і ситуаційних задач.

ЗАГАЛЬНІ ПРАВИЛА БЕЗПЕЧНОЇ РОБОТИ В УЧБОВИХ ЛАБОРАТОРІЯХ ПІД ЧАС ЗАНЯТЬ

Студенти при вході до лабораторії повинні одягати халати. Кожен студент повинний працювати на закріпленому за ним місці. Перехід на інше місце без дозволу викладача не дозволяється. Робоче місце потрібно тримати в чистоті, не загроможувати його посудом та сторонніми предметами, по закінченні роботи прибрати всі прилади в шафу.

Прилади та установки загального використання (терези, прилади для визначення температур плавлення, кипіння, установки для перегонки та ін.) встановлюються окремо. Робоче місце забороняється загроможувати склянками з реактивами, непотрібними в даний момент приладами, посудом і сторонніми предметами.

Під час роботи в лабораторії потрібно дотримуватись тиші, порядку і чистоти, не допускати поспішності, безпорядку та неохайності.

Забороняється відвідування студентів, працюючих у лабораторії сторонніми особами, а також відволікання студентів сторонніми справами або розмовами.

Студентам забороняється працювати в лабораторії у відсутності викладача або лаборанта, а також у невстановлений час без дозволу викладача.

Категорично забороняється виконувати в лабораторії експериментальні роботи, не пов'язані з виконанням учбового практикуму. До виконання роботи студенти можуть приступити тільки після проходження інструктажу по техніці безпеки і дозволу.

Починаючи роботу необхідно:

- з'ясувати методику роботи;
- перевірити правильність збору приладу чи установки; перевірити відповідність взятих речовин згідно з методикою роботи.

Після закінчення роботи необхідно:

- вимикати електроенергію, виключати газ, воду;
- прибрати в шафу реактиви, чистий скляний посуд;
- поставити металеві штативи на встановлене місце на столі;
- віднести брудний посуд для миття;
- витерти поверхню стола ганчіркою.

Прилади та установки загального використання (терези, прилади для визначення температур плавлення, кипіння і т.д.) після заняття потрібно прибрати з робочого місця у відведене місце для зберігання.

На початку кожного заняття викладач повинен проводити короткий інструктаж про заходи безпеки при роботі з препаратами, приладами, інструктаж фіксується в журналі.

Робота з отруйними та сильнодіючими речовинами

1. До роботи з отруйними та сильнодіючими речовинами допускаються тільки особи, які пройшли спеціальний інструктаж по техніці безпеки.

2. Склянки та іншу тару з отруйними та сильнодіючими речовинами забороняється ставити в ящики робочих столів, для роботи з цими речовинами виділяються спеціальні місця.

3. Наповнювати пробірку з отруйними та сильнодіючими речовинами потрібно сифонами або спеціальними піпетками з гумовою грушею.

4. Розсипану отруйну або сильнодіючу речовину потрібно негайно зібрати, а ділянку, на яку речовина потрапила, знешкодити і ретельно промити водою.

5. Використані при роботі проби, продукти дезактивації та промивні води потрібно зливати в спеціальну тару; зливати ці речовини в каналізацію забороняється.

6. Отруйні та сильнодіючі речовини, які використовуються в лабораторії, а також розчини зберігаються в спеціальному ящику під замком і пломбою.

7. В усіх випадках отруєння отруйними та сильнодіючими речовинами викликається швидка медична допомога.

Робота з їдкими лугами та кислотами

1. Мінеральні кислоти небезпечні викликають локальні хімічні опіки. Концентровані кислоти, крім того, можуть виділяти їдкий пар, викликаючи подразнення дихальних шляхів.

2. Луги при потраплянні на шкіру і слизові оболонки спричиняють некротичну дію.

3. Для попередження опіків при різних роботах з їдкими речовинами (кислотами та лугами) усі працюючі в лабораторії повинні користуватись захисними окулярами (з шкіряною або гумовою оправою) і гумовими рукавицями, в окремих випадках - гумовими фартухами.

4. Виконання робіт з кислотами і лугами без захисних окулярів забороняється! Робота з концентрованими кислотами лугами виконуються тільки під тягою (у витяжній шафі).

5. Бутилі з кислотами необхідно зберігати в полагоджених кошиках чи обрешітках, переносити вдвох або перевозити на спеціальному візку, попередньо перевіривши цілісність тари.

6. Переливати кислоти та луги з банки в дрібну тару необхідно з допомогою сифона або ручного насоса різної конструкції.

7. Для приготування розчинів кислот необхідно кислоту повільно лити у воду тонким струменем при безперервному помішуванні. Лити воду в кислоту забороняється!

8. Використовувати сірчану кислоту у вакуум-ексікаторах як водопоглинаючого засобу забороняється.

9. Робота з бромоводневою кислотою потребує особливої обережності. Попадання кислоти на шкіру, в особливості на нігті, викликає сильний біль і довго заживаючі рани. Вдихання парів бромоводневої кислоти викликає запалення верхніх дихальних шляхів та псування зубів.

10. Рідини, які викликають опіки або отруєння, забороняється набирати ротом або через піпетки.

11. Розчиняти луки необхідно шляхом повільного додавання до води невеликих шматочків речовин при безперервному помішуванні. Шматочки лугів брати тільки щипцями. Великі шматки їдких лугів необхідно подрібнювати на дрібні шматочки в спеціально відведеному місці, попередньо накривши шматки, які подрібнили, густим матеріалом (бельтингом).

12. Розлиті кислоти та луки необхідно засипати піском, промити після цього місця, куди була пролита кислота чи луг, водою. Пісок збирається пластмасовою лопаткою або совком у смітник для відходів.

13. При опіках кислотою поранене місце промивають великою кількістю води, потім розчином гідрокарбонату натрію та змащують маззю від опіків.

14. При потраплянні кислоти в очі необхідно провести ретельне промивання водою.

15. При потраплянні луга на шкіру потрібно терміново промити уражене місце великою кількістю води, потім - однопроцентним розчином оцтової кислоти і замастити маззю від опіків.

16. При потраплянні луга в очі спочатку промивають очі великою кількістю води, потім - двоохпроцентним розчином борної кислоти і знову водою.

17. При потраплянні броду на шкіру потрібно терміново промити уражену ділянку шкіри органічним розчинником: бензолом, бензином чи етанолом. Можна використовувати гліцерин та мазь від опіків.

ЗМІСТ

Список скорочень.....	
1. Вступ.....	
1.1. Вибір біозразків для скринінгу.....	
2. Підготовка біозразків для скринінгу.....	
2.1. Вплив рН середовища водної фази на екстракцію речовин із різними кисотно-основними властивостями	
2.3. Дериватизація.....	
3. Хроматографічний аналіз.....	
3.1. Розрахунок часу утримання.....	
3.2. Пошук цільових сполук на хроматографах.....	
Література.....	
Додаток.....	

Список скорочень

Ас-ацетильованепохідне
АсА-оцтовий ангидрид
BSA-(N,O-біс(триметилсиліл)ацетамід
Вu-олійний ефір
ВuОН-н-бутанол
ВuСl-бутилхлорид(хлорбутан)
ВЕРХ-високоєфективна рідинна хроматографія
ВЕРХ/МCD-ВЕРХ із мас-селективним детектуванням
ГХ-газова хроматографія
ГХ/МCD-газова хроматографія із мас-селективним детектуванням
І-ВuОН-ізобутанол(бутанол-2)
Ме-метиловий ефір
НFВ-гептафторолійний ефір
НУ-кислотний гідроліз
РКа-негативний логарифм константи іонізації кислоти
РFВ-пентафторбензилове похідне
РFР-пентафторпропіоновий ефір
Рr-пропіловий ефір
Рго-пропіоновий ефір
СНCl₃-хлороформ
СКВ-середньоквадратичне відхилення
СМЕ-судово-медичка експертиза
SІM-селективний іонний моніторинг
ТМАН-тетраметиламонію гідроксид
ТМС-триметилсиліл-ефір
ТFА-трифтороцтовий ефір
ФОС-фосфорорганічна сполука

1. Вступ

Газова хроматографія на капілярних колонках широко застосовується за кордоном України у судовій та клінічній токсикології для рутинного скринінгу наркотичних, лікарських засобів, їх метаболітів, пестицидів та ФОС у біологічних рідинах та волоссях[1-9]. Особливу популярність в теперішній час набуває систематичний токсикологічний аналіз, який проводиться методом газової хроматографії із мас-селективним детектором, так як цей метод дозволяє з високим ступенем надійності проводити детектування одночасно значної кількості важливих речовин у біозразках. У закордонній літературі (Journal of Chromatography, Journal of Analytical Toxicology та інші) періодично друкуються огляди, які присвячені систематичному токсикологічному аналізу наркотичних та лікарських речовин.

Звичайна стратегія аналітичної процедури токсикологічного аналізу включає на першому етапі скринінгові тести, на другому етапі підтверджуючий аналіз проб, які дають позитивні реакції при проведенні скринінгу, другим незалежним методом із кількісним визначенням речовини, що аналізується. Однак така двоступенева процедура оптимальна для аналізів, у яких проводиться ідентифікація речовин, що входять у певний перелік, наприклад, при допінг-контролі або аналізі наркотичних речовин. У судовій і особливо в клінічній токсикології, з нашої точки зору, неможливо обмежувати заздалегідь певним переліком речовин, а для скринінгу необхідно використовувати метод, який охоплює як омога ширше коло потенційних токсикантів. У теперішній час в Україні дуже швидко поширюється як коло закордонних лікарських психотропних речовин, так і нових синтетичних наркотичних речовин, які знаходяться у незаконному обороті. Деякі з цих речовин (LSD, бупренорфін, похідні фентанілу, низькодозові похідні бенздіазепіну та інші, можуть бути визначені у біорідинах тільки дуже чутливими методами, такими як ГХ/МСД або

ВЕРХ/МСД. Існують тисячі лікарських речовин, наркотиків, пестицидів, ФОС та інших отрут, які можуть бути причиною інтоксикації і смерті. Деякі речовини в організмі повністю метаболізуються, тоді у сечі та плазмі можуть бути визначені тільки їх метаболіти. З іншого боку, усі метаболіти мають бути ідентифіковані в ході аналізу і бути визначенні з іншими потенційними токсикантами та з ендogenous речовинами. З точки зору визнаних спеціалістів у токсикологічному аналізі Н.Н.Маугера та R.A. deZeeuw [10-11], застосування неспецифічних хроматографічних методів, навіть якщо їх об'єднати, недостатньо для цілей надійної ідентифікації, особливо у судовій токсикології. За цієї причини настає гостра необхідність в застосуванні систематичного токсикологічного аналізу, який базується на застосуванні для аналізу у біорідинах методу ГХ/МСД, як найбільш універсального, високочутливого і специфічного методу для скринінгу або підтвердження наявності токсикантів у організмі, які можуть бути визначенні методом газової хроматографії. Скринінг методом ГХ/МСД може бути проведений з використанням реконструйованих мас-хроматограм по характеристичним іонам або пошук за груповими іонами, який був запропонований Н.Н.Маугер у працях [4,7,11]. Позитивні сигнали пошуку за характеристичним або за груповим іоном може бути підтверджений порівнянням повних мас-спектрів із тими, що наведені у довіднику.

У нашій роботі наведений загальний підхід до скринінгу наркотичних, лікарських засобів і біорідинах методом ГХ/МСД, який був розроблений на кафедрі токсикологічної та неорганічної хімії Запорізького державного медичного університету та у Запорізькому обласному бюро судово-медичної експертизи в останні п'ять років. У подальшому ми наведемо конкретні аналітичні дані для практичної ідентифікації деяких груп та окремих представників наркотичних і лікарських речовин, їх метаболітів і дериватів. Слід відзначити, що наведені аналітичні дані одержані в результаті проведення конкретної експертної роботи і не завжди охоплюють ідентифікацію повного кола метаболітів наркотичних і лікарських речовин.

Однак ці дані дозволяють, як правило, визначити натівну речовину(якщо це можливо) і дин або два найбільш важливих метаболітів, що достатньо для надійного визначення факту прийому препаратів.

1.1 Вибір біозразків для скринінгу

Значна частина авторів методик скринінгу наркотичних і лікарських речовин [1,4,6,9] мають спільну точку зору, що для скринінгу та ідентифікації невідомого лікарської або наркотичної речовини краще за все підходить сеча, так як концентрації лікарських, наркотичних речовин та їх метаболітів у сечі досить великі відносно їх концентрації у крові або плазмі. Крім того, у деяких випадках у сечі метаболіти визначаються у більш високих концентраціях і протягом більш значного часу, ніж нативні речовини [6].

Концентрація токсикологічно важливих речовин у плазмі або суцільної крові у багатьох випадках дуже низька для проведення скринінгу. Однак в літературі наведені методики, які використовують ГХ із азотно-фосфорним мас-селективним детектором для скринінгу більшої групи наркотичних і лікарських речовин у крові для цілей токсикологічного аналізу[1,12], а також методики для скринінгу окремих груп лікарських і наркотичних речовин бензодіазепінів [13,14,15], барбітуратів [16], амфетамінів [17], канабіноїдів [18], фенотіазінів [19], антиепілептиків, антидепресантів, нейролептиків та опіатів [15,20,21]. Кров мерців через її високу в'язкість, у порівнянні з плазмою або суцільною кров'ю живих людей, представляє значну проблему для більшості методів пробо підготовки [9]. У більшості випадків зразок крові або плазми аналізуються для кількісного визначення токсиканта, визначеного при скринінзі сечі. Токсикологічний аналіз волосся завжди визначає тільки хронічну інтоксикацію або неодноразовому вживанні [4].

У зв'язку із вищезазначеним, головним об'єктом скринінгу на наркотичні і лікарські речовини є сеча. Тільки при її відсутності для проведення скринінгу береться кров мерця. У зв'язку із значною кількістю баластних речовин, які екстрагуються з крові при її пробо підготовці, аналіз

крові може гарантувати тільки наявність заздалегідь обумовленого переліку наркотичних і лікарських речовин. При наявності сечі кров мерця використовується тільки для аналізу найбільш розповсюджених наркотичних та психотропних речовин (група опія, діазепам, амітриптилін, тизерцин, клозапін, димедрол) та тих, аналіз яких у сечі незвичний з-за інтенсивного метаболізму (група атропіна). Аналіз крові на опіати крім скринінгу сечі проводиться також, тому що при передозуванні героїну (особливо у поєднанні із алкоголем) часто смерть відбувається настільки швидко, що морфін не має часу вийти з організму із сечею у значній кількості, що може дати негативний результат аналізу сечі та опіати [22] при наявності морфіну у крові.

2. Підготовка зразків для скринінгу

Підготовка зразків біорідин перед аналізом повинна забезпечити:

1. Розклад кон'югатів, так як більшість полярних метаболітів наркотичних і лікарських речовин виводяться із сечею у кон'югованому вигляді.
2. Ізолювання аналізованих речовин з біоматеріалів.
3. Дериватизацію полярних важколетких наркотичних, лікарських речовин та їх метаболітів.
4. Провести переочищення екстракту (якщо необхідно).

В той же час важливо, щоб при підготовці зразків у аналізованих сполуках не зруйнувалися їх основна структура, так як це приведе до труднощів їх ідентифікації. Для розкладу кон'югатів зазвичай застосовується або м'який, але тривалий ензимний гідроліз, або більш жорсткий прямий кислотний гідроліз. За звичай ензимний гідроліз використовується у допінг-контролі та для аналізу деяких груп сполук, чутливих до кислотного гідролізу (типу 1,4-бензодіазепінів, кокаїну та інші). Для токсикологічних аналізів (особливо термінових) за звичай переважно кислотний гідроліз [4]. При цьому обов'язково необхідно врахувати можливість гідролізу сполук, які мають складно-ефірні та амідні зв'язки, а також іноді і прості ефірні зв'язки.

Для цілей скринінгу наркотичних і лікарських речовин нами було застосовано кислотний гідроліз у розчині 7 хлоридної кислоти. Продукти гідролізу, які при цьому утворюються та їх деривати наведені далі у розділі, що присвячений ідентифікації окремих груп аналізованих сполук.

В обзорі [4] Н.Н. Maurer робить висновок, що автори методик систематичного токсикологічного аналізу для процедур пошуку невідомої отрути віддають перевагу рідинно-рідинній екстракції, як найбільш універсальний метод ізолювання. В той же час для підтвердження наявності певного вигляду наркотичної або лікарської речовини перевагу віддають твердо фазній екстракції. У більш пізньому огляді [9] О. Drummer пише, що автори віддають перевагу твердо фазній екстракції для підготовки зразків до аналізу методом ТХМСД та рідинно-рідинну екстракцію для аналізу зразків за допомогою ВЕРХ.

Відомо, що за допомогою рідинно-рідинної екстракції до органічної фази переходять речовини, які знаходяться в неіонізованому вигляді (за принципом подібне розчиняється у подібному). Залежність долі неіонізованих форм основи та кислоти від рН середовища можливо розрахувати за формулами:

$$a_b (\text{доля неіонізованої форми основи}) = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}}$$

$$a_a (\text{доля неіонізованої форми кислоти}) = \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}}$$

де pK_a – константа іонізації кислоти, яка супряжена із основою.

В ідеальному випадку, коли неіонізована форма практично нерозчинна у воді і добре розчинна у слабо полярному органічному розчиннику, а іонізована форма сполуки, навпаки, нерозчинна в органічному середовищі і добре розчинна у водній фазі, саме за цими формулами можливо орієнтовно розрахувати долю аналізованої сполуки, яка виділяється у органічну фазу у залежності від рН водного середовища. Відомо, що класичні схеми хіміко-токсикологічного аналізу [23,24] пропонують окреме ізолювання та аналіз сполук кислотного і основного характеру. Однак при цьому приходиться аналізувати у крайньому випадку

два зразки однієї біорідини, якщо ж врахувати аналіз слабо летких і полярних метаболітів та аналізувати вже необхідно три і більше зразків однієї біорідини. При значному завантаженні судово-хімічних відділень бюро СМЕ та за браком необхідного обладнання у них аналізувати велику кількість зразків однієї біорідини досить дорого та неефективно. Проте, деякі автори [1,15] проводять скринінг із однієї фракції біорідини і одержують задовільні результати по ізолюванню речовин як основного, так і кислотного характеру. Це явище неможливо пояснити, якщо керуватися тільки згаданим вище співвідношенням між рН водної фази та ступенем витягання з неї слабополярних і лікарських речовин. Для пояснення цього явища нами було виконанні модельні експерименти по екстракції із водних розчинів лікарських речовин із різними кислотно-основними властивостями.

2.1. Вплив рН середовища водної фази на екстракцію речовин із різними кислотно-основними властивостями.

У якості модельних вибрані три речовини з переліку «Токсикологічних речовин, які піддаються судово-хімічному дослідженню у лабораторіях бюро СМЕ Міністерства охорони здоров'я України» (Наказ МОЗ України за № від), які володіють різними кислотно-основними властивостями:

- фенобарбітал, речовина кислого характеру, яка володіє одним з самих низьких $pK_a=7$,
- атропін, одно з самих сальних основ, pK_a супряжена з основністю кислоти = 10
- морфін – амфоліт $pK_1=8$, $pK_2=9,9$.

Морфін сам по собі має велике токсикологічне значення і може бути моделлю для дослідження поведінки при екстракції великого кола метаболітів, що мають декілька полярних ОН-груп різної природи. Такі речовини значно більш гідрофільні, ніж більшість лікарських і наркотичних речовин, і тому при їх ізолюванні з біорідин, зазвичай, виникають проблеми. Всі три речовини відповідають вимогам, які необхідні для розрахунку ступеню виділення за формулами для ступені іонізації, так як їх неіонізовані

форми добре розчиняються у органічному розчиннику (хлороформі) і слабо розчинні у воді та навпаки, іонізовані форми значно краще розчинні у воді, ніж у органічних розчинниках [23]. Результати попереднього розрахунку ступеню іонізації і долі неіонізованої форми для цих речовин у залежності від рН середовища наведені на рисунку 2.1. Як видно з рисунку, немає такого регіону рН, у якому за розрахунком всі три речовини мали би значну долю неіонізованої форми і, отже, ізолювалися би разом у значних кількостях. Експериментальне вивчення ізолювання цих речовин проведено методами екстракції (в хлороформі та суміші хлороформ з ізобутанолом 6:1) і сорбції на Полісорбі-1. Суміш хлороформ - ізобутанол (6:1) вибрана з відомого списку змішаних розчинників для екстракції гідрофільних лікарських речовин з водних розчинників на підставі проведених експериментів по визначенню ступеня та стабільності виділення морфіну та кодеїну із сечі при рН=8,6. Результати визначення ступеня виділення морфіну та кодеїну деякими сумішами розчинників наведені на рисунку 2.2. За 100% прийняті максимальні ступені виділення, які спостерігаються у даних дослідах. Ми не провадили експерименти із сумішами хлороформ – етинол і хлороформ – ізопанол, так як ці суміші розчинників екстрагують дуже велику кількість ендогенних речовин, які заважають подальшому хроматографічному аналізу [25]. З рисунку видно, що найбільша ступінь виділення морфіну та кодеїну спостерігається для суміші хлороформ:ізобутанол (6:1), трохи гірше результати одержані для суміші хлороформ: н-бутанол (9:1). Об'ємне співвідношення хлороформ:ізобутанол було вибрано на підставі вивчення відтвореності дослідів по екстракції морфіна і кодеїна з сечі з концентраціями по 300 мг/мл (рекомендований міжнародними організаціями [26] рівень Cutoff для опіатів). На рисунку 2.3 наведені, визначені в ході дослідів концентрації морфіна і кодеїна, а також помилки їх визначення (n=8). Видно, що екстрагенти із співвідношенням хлороформа до ізобутанола 6:1 та 4:1 володіють статистично не розпізнавальні середніми значеннями концентрації морфіна

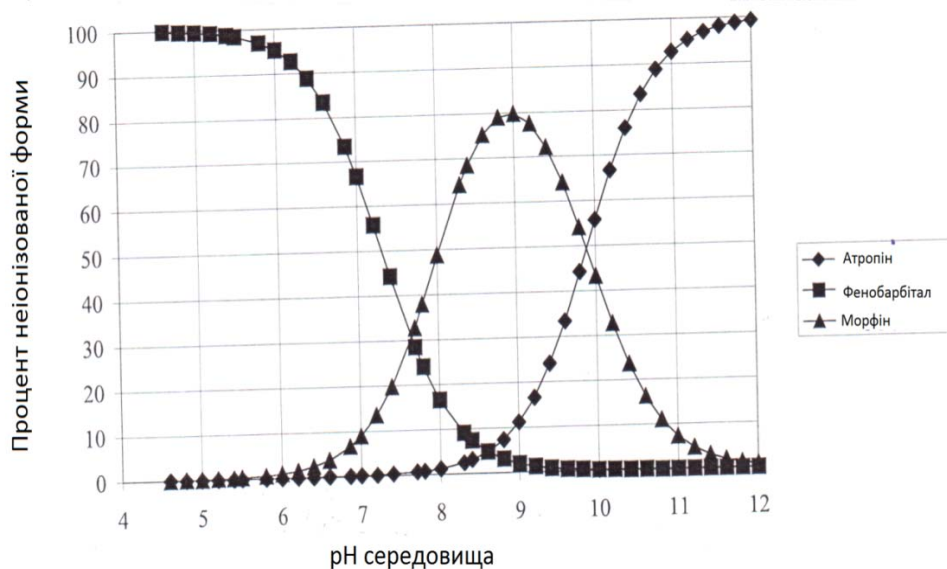


Рис. 2.1 Залежність долі неіонізованих форм атропіна, фенобарбітала і морфіна від рН середовища

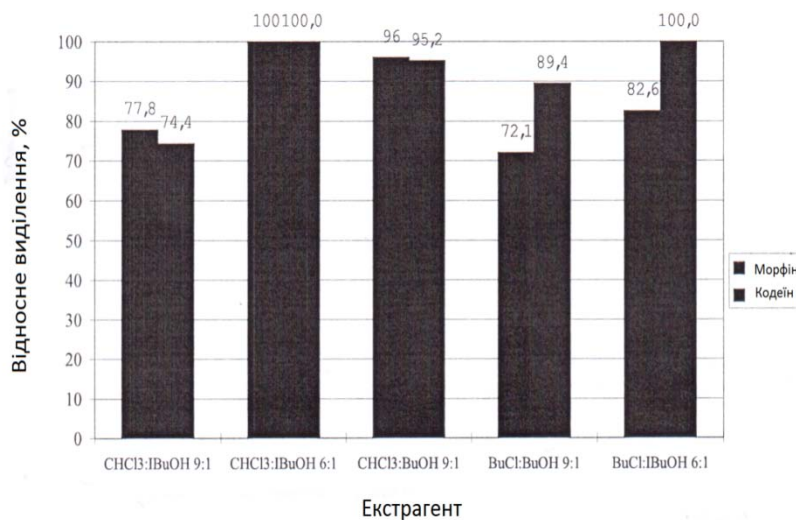


Рис. 2.2. Відносний ступінь виділення морфіну і кодуїна сумішами розчинників

і кодеїна і приблизно однаковою дисперсією, однак суміш хлороформа з ізобутанолом 4:1 надає більший фон ендогенних сполук у екстракті, тому для подальших досліджень нами була вибрана суміш хлороформ – ізобутаном 6:1.

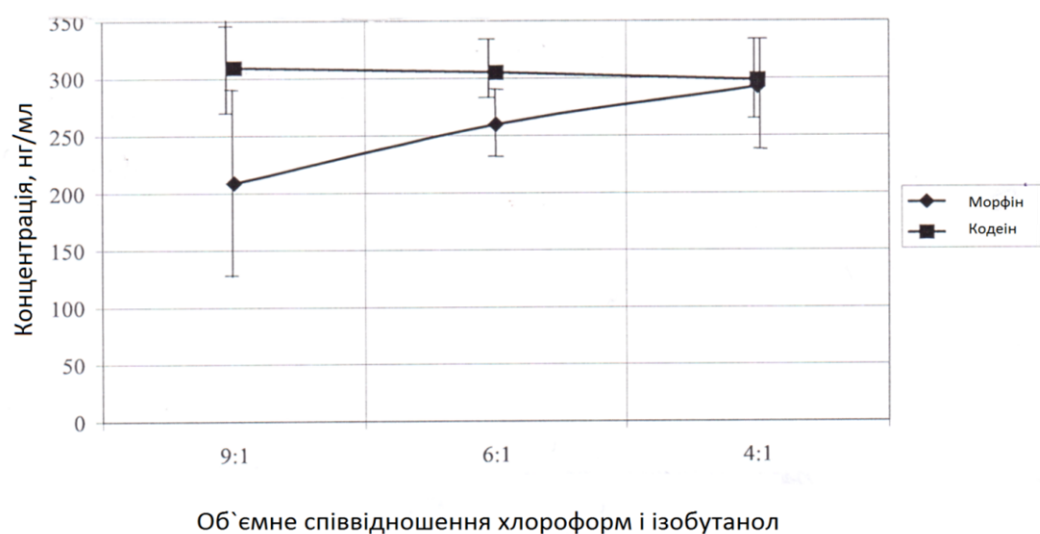


Рис. 2.3. Концентрації морфіна і кодеїна, які визначенні при екстракції сумішами хлороформ – ізобутаном

Визначення ступеня виділення модельних речовин шляхом екстракції.

До 1 мл буферного розчину із рН=4,3; 5,5; 6,86; 7,7; 8,3; 8,8 (фосфатні буферні розчини), 9,2; 10,0 (боратні буферні розчини), і 12,0 (аміачний буферний розчин) додавалася по 20 мкл етанольного розчину фенобарбітала з концентрацією 1 г/л, по 50 мкл метанольних розчинів морфіну і атропіна із концентрацією 0,1 г/л і по 5 мл органічного розчинника. Після екстракції протягом п'яти хвилин за допомогою струшувача АВУ-6М від кожної проби відбиралися по 4 мл органічного екстракта, який пропускався через 1г безводного сульфата натрія, шар солі промивався 1 мл хлороформа і екстракт поділявся навпіл. В одній половині екстракту (після його випарювання) методом ультрафіолетової спектро фотометрії за методикою [24] визначено вміст фенобарбітала, а до другої половини екстракта додано 10 мкл метанольного розчину етилморфіну з концентрацією 0,3 г/л (внутрішній стандарт), екстракт був випарований досуха потіком повітря. До сухого залишку додавалася 70 мкл BSA, суміш нагрівалася 15 хвилин при 80°C. 1 мкл одержаної суміші досліджувався методом ГХ/МС на хроматографі НР-

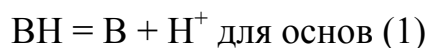
5890 з мас-селективним детектором HP-5972 в режимі SIM по іонам 361, 124, 140 (атропін -ТМС ефір), 429, 414, 401 (морфін – 2ТМС ефір), 385, 357, 356 (внутрішній стандарт – ТМС - ефір). У якості зразків порівняння (стандарт із 100% ступенем виділення) цими же методами досліджувалися 8 мкг фенобарбітала (8 мкл розчину з концентрацією 1 г/л) і суміш, яка складалася з 2 мкг атропіна (20 мкл розчину з концентрацією 0,1 г/л), 2 мкл морфіна (20 мкл розчину з концентрацією 0,1 г/л) і 3 мкг етилморфіна (10 мкл розчину з концентрацією 0,3 г/л). У якості органічної фази при екстракції використовувалися хлороформ і суміш хлороформа з ізобутанолом в об'ємних співвідношеннях 6:1.

Визначення ступеня виділення модельних речовин за допомогою сорбції.

До 1мл буферних розчинів, перелік яких наведено вище, додавалася по 20 мкл етанольного розчину фенобарбітала з концентрацією 1г/л, по 50 мкл метанольних розчинів морфіна і атропіна з концентрацією 0,1 г/л. Одержані розчини пропускалися із швидкістю 1 мл/хв. крізь попередню кондиціонований сорбент Полісорб – 1 фракція 0,1 – 0,25 мл якого брали у кількості 4,2 г. Сорбент кондиціонувався 2 мл метанола і 2 мл відповідного буферного розчину. Після сорбції сорбент промивався і висушувався під вакуумом 15 хвилин. Елюювання проводилося 2 мл метанола. Далі по 2/5 метанольних елюатів використовувалися для визначення фенобарбітала, атропіна і морфіна за методикою, яка наведена вище у розділі екстракції.

Всі точки експерименту по екстракції і сорбції були проведені не менш як два рази, паралельні виміри усереднювали. Результати експеримента наведені на рисунках 2.4 – 2.7. На рисунку 2.4 наведені розрахункові та експериментальні криві виділення при екстракції хлороформом. Загальний вигляд розрахункових і експериментальних кривих для фенобарбітала і атропіна однаковий, однак експериментальна крива для фенобарбітала зсунута по осі рН на 1,5 – 2 одиниці в сторону збільшення рН. Зворотно, експериментальна крива для атропіна зсунута по осі рН на 1,5 – 3 одиниці в сторону зменшення рН. Експериментальна крива для морфіна, хоча і має

невеликий максимум при рН біля 9 (як передбачає теорія), але ступінь виділення при цьому не перевищує 25% та нестабільна. Такий хід експериментальних кривих виділення для фенбарбітала і атропіна може бути пояснений зміщенням кислотно – основної рівноваги у водній фазі при контакті її з органічним розчинником. Так як у водній фазі існує рівновага між іонізованою і неіонізованою формами:



то при контакті водної фази з органічною до останньої селективно переходять тільки наіонізовані форми. Значної зміни рН водної фази з-за утворення або зв'язування іонів H^+ за реакціями 1 та 2 також не відбудеться з-за використання буферних розчинів. Якщо продукти реакції віддаляються з зони реакції, то система прямує відновити рівновагу і виходить, що частина залишених у водній фазі іонізованих форм знову будуть перетворюватися за наведеними вище реакціями у нові порції неіонізованої форми і так далі. Виходить, з-за зсуву кислотно – основної рівноваги у водній фазі при контакті її з органічним розчинником у органічну фазу при даному значенні рН середовища водної фази буде переходити більше основи і більше кислоти, ніж це можливо очікувати при розрахуванні за формулами для констант іонізації. Це явище ми і спостерігали на практиці (див. рис. 2.4). Враховуючи йе явище,

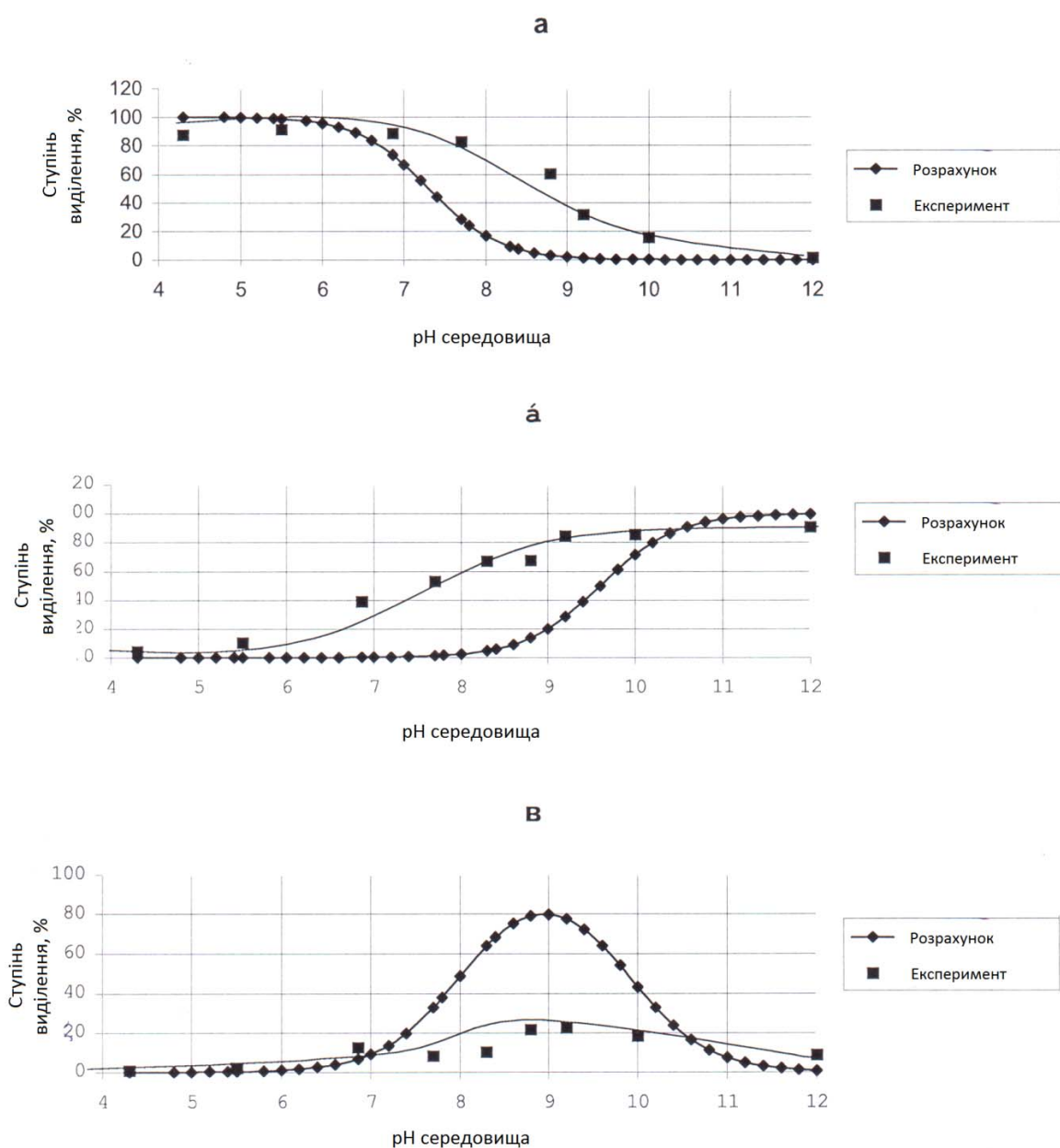


Рис.2.4 Розраховані та експериментальні криві ступеня виділення фенобарбітала (а), атропінв (б) і морфіна (в) в залежності від рН середовища при екстракції хлороформом

з'являється реальна можливість одночасного виділення при певному рН середовища речовин як кислотного, так і основного характеру. На рисунку 2.5 зона спільного виділення фенобарбітала і атропіна заштрихована. Виділення морфіна

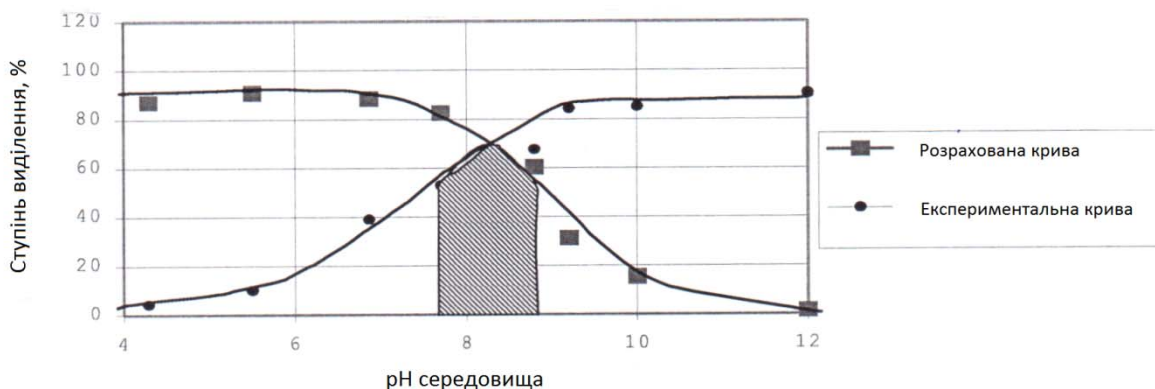


Рис. 2.5. Розраховані та експериментальні криві виділення фенобарбітала і атропіна в залежності від рН середовища при екстракції хлороформом

(і значної кількості гідрофільних метаболітів лікарських речовин) в хлороформ, як і очікувалося, при цих умовах знаходиться на низькому рівні. Тому виділення за допомогою хлороформа можна рекомендувати тільки для відносно слабополярних і гідрофільних речовин. Однак, є відомий спосіб збільшення виділення полярних гідрофільних речовин підвищенням полярності органічного розчинника за рахунок додавання до слабополярного розчинника більш полярних компонентів [23,24]. На рисунку 2.6 наведені експериментальні криві виділення фенобарбітала, атропіна і морфіна при екстракції сумішшю хлороформ – ізобутанол 6:1 (п об'єму). Видно, що загальний хід

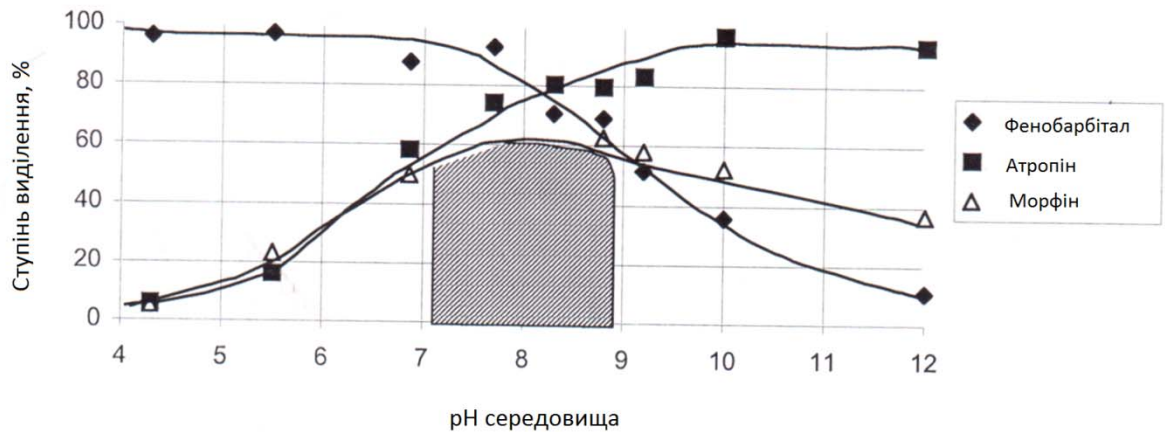


Рис. 2.6. Експериментальні криві виділення фенобарбітала, атропіна і морфіна у залежності від рН середовища при екстракції сумішшю хлороформ – ізобутанол (6:1)

кривих для фенобарбітала і атропіна у порівнянні з екстракцією хлороформом мало змінився, проте значно піднявся рівень виділення морфіна і в рівній мірі поширився регіон сумісного виділення всіх трьох модельних речовин (заштрихований). У цьому регіоні при екстракції сумішшю хлороформ і ізобутанол ступінь виділення не знижується нижче 50%. Ці обставини дають реальну можливість використовувати регіон рН від 7,2 до 9 для одночасного скринінгу всього кола речовин та їх полярних метаболітів. Слід відзначити, що автори праць [1,15], що пропонують одночасне виділення всього кола аналізованих речовин проводили при значеннях рН, які близьки до тих, що запропоновані у данній праці.

На рисунку 2.7 наведені експериментальні криві виділення фенобарбітала, атропіна і морфіна при сорбції на Полісорбі-1. Видно, що регіон спільного виділення усіх трьох модельних речовин хоча і існують, але значно звужився і змістився до регіону більш низьких значень рН (7,3-8,1). Неспівпадання регіону максимального виділення морфіна рН (8,5-10,5) і регіону спільного виділення всіх трьох модельних речовин робить сорбцію на Полісорбі-1 менш технологічним варіантом для проведення скринінгу, ніж екстракція сумішшю хлороформ:ізобутанол.

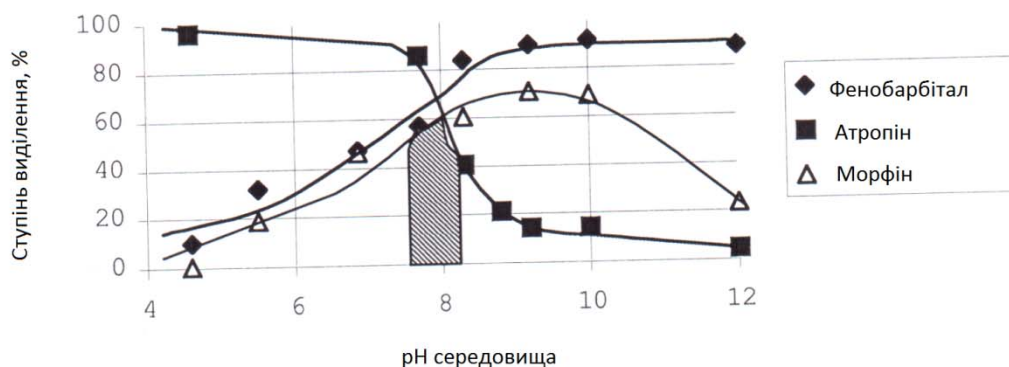


Рис. 2.7. Експериментальні криві виділення фенобарбіталу, атропіну і морфіну у залежності від рН середовища при витягуванні сорбцією на Полісорбі-1

Таким чином, з трьох опробованих варіантів виділення модельних речовин для проведення скринінгу рекомендується екстракція сумішшю хлороформ:ізобутанол (6:1) при рН водної фази від 7,2 до 9.

2.2. Перевірка ступеня виділення деяких наркотичних і лікарських речовин з біорідин

З метою перевірки запропонованого регіону рН для виділення широкого кола наркотичних, лікарських речовин, їх метаболітів і продуктів гідролізу(для речовин, які гідролізуються у кислому середовищі). Нами проведені експерименти по виділенню цих речовин із сечі після гідролізу при рН 8,4-8,6(свіже виготовлений насичений розчин гідрокарбоната натрія) сумішшю хлороформ:ізобутанол(6:1).

Методика експеримента: До 1мл «холостої» сечі додавалася до 25мл спиртовихрозчинів суміші лікарських і наркотичних речовин для досягнення їх концентрації у сечі на рівні 0,5-1мкг/мл. Для визначення ступеня виділення метаболітів і продуктів гідроліза у якості стандартних розчинів, які додаються до сечі, використовувалися етанольні розчини екстрактів сечі з позитивних експертиз після гідролізу сечі. До зразків додавалося по 100мл гідрокарбоната натрію. Проводилася перевірка рН середовища на папері

«Рифан», потім зразки екстрагувалися 5мл суміші хлороформ-ізобутанол 6:1(за об'ємом). Після екстракції протягом 5 хвилин на струшувачі АБУ-6м від кожної проби відбиралося по 4мл органічного експерта, який пропускався крізь 1г безводного сульфата натрію. Шар солі промивався 1мл хлороформа, до органічної фази додавалося по 20мкл розчину внутрішнього стандарта(циклізінін-0,04г/л), розчинник випаровувався потоком повітря. До сухих залишків додавалося по 100мкл метанола і 1мкл аналізувався методом газової хроматографії за допомогою хроматографа НР-5890 із мас-селективним детектором НР-5972 у режимі сім за двома характеристичними іонами для кожної аналізованої речовини. У якості зразка порівняння(стандарт із 100%ступенем виділення) використовувалася суміш з 20мкл тих же самих сумішей лікарських і наркотичних речовин, які додавалися до сечі, і 20мкл розчину внутрішнього стандарта(циклізінін-0,04г/л). До зразка порівняння додавався метанол до загального об'єму 100мкл і потім проводився аналіз способом аналогічно тому, який був описаний вище. Деякі сполуки аналізувалися у вигляді ТМС, метилових ефірів або ацетильованих похідних. У цих випадках:

- для одержання ТМС ефірів до сухих залишків після випарювання розчинників додавалося по 70мкл BSA, суміш нагрівалася 15 хвилин при 80°C. 1мкл одержаної суміші досліджувався методом ТХ/МСД у режимі сім за характеристичними іонами ТМС похідних сполук, які аналізувалися;
- для одержання метилових ефірів до сухих залишків додавалося 20мкл 5% розчину ТМАН в метанолі та 100мкл безводного диметилсульфоксиду. Після двохвилинної витримки додавалося 20мкл метилйодиду, суміш витримувалася при кімнатній температурі 10 хвилин при періодичному перемішуванні. Далі до суміші додавалося 200мкл 0,1н. розчину хлоридної кислоти та 3мл хлороформа. Після екстракції протягом 5 хвилин хлороформний шар переносився до чистого флакону і випарювався струмом повітря до сухого залишку. До

сухого залишку додавалося 100мкл метанола і 1мкл досліджувався методом ТХ/МСД у режимі sim за характеристичними іонами метилових ефірів аналізованих сполук;

- для одержання ацетильованих похідних до сухих залишків після випарювання розчинників додавалася 40мкл оцтового ангідриду і триетиламіну, суміш нагрівалася 20 хвилин при 80°C і надлишок реагентів випаровувався струмом повітря при 40°C. Сухий залишок розчинявся у 100мкл етилацетата і 1мкл досліджувався методом ТХ/МСД у режимі sim за характеристичними іонами ацетильованих похідних аналізованих речовин.

Зразки порівняння для цих сполук також піддавалися дериватизації і аналізу у вигляді відповідних похідних. В таблицях 2.1 і 2.2 наведені данні за ступенем виділення значної групи наркотичних і лікарських речовин, а також деяких метаболітів і продуктів гідролізу. У стовпці 4 таблиці наведені назви похідних, які аналізувалися, якщо аналіз проводився у нативному вигляді, у цьому стовпці стоїть знак «-». З наведених даних видно, що для більшості лікарських і наркотичних речовин, із яких проводився експеримент, ступінь виділення при зазначених умовах вище 70%, для всіх інших вона не нижче 50%.

Таблиця 2.1

Експериментальні ступені виділення з сечі деяких наркотичних, лікарських речовин

№з.п.	Назва речовини	pKa	Похідні	Ступінь виділення,%
1	Адфенін(Спазмолітин)		-	81,5
2	Алімемазин(Терален)	9,0	-	78,0
3	Амідопірин	5,0	-	51,7
4	Аміназин(Хлорпромазин)	9,3	-	74,5
5	Амітриптилін	9,4	-	77,1

Продовження таблиці 2.1				
№з.п.	Назва речовини	pKa	Похідні	Ступінь виділення, %
6	Амобарбітал(Барбаміл)	7,9	Me	96,2
7	Амфетамін	9,9	Ac	66,3
8	Анабазин	Н.д.	Ac	67,5
9	Атропін	10,0	TMC	75,1
10	Ацепромазин	9,3	-	61,3
11	Барбітал	8,0	Me	90,5
12	Бромгексін	8,5	-	86,0
13	Бутадіон	4,5	-	96,9
14	Верапаміл	8,9	-	54,6
15	Гексабарбітал	8,2	Me	95,2
16	Діазепам	3,3	-	76,3
17	Діклофенак	4,2	-	89,9
18	Дифенгідрамин(Димедрол)	9,0	-	90,2
19	Динезін		-	76,7
20	Дипразін	9,1	-	63,9
21	Імізин	9,5	-	76,4
22	Індометацин	4,5	Me	73,5
23	Карбамазепін		-	78,1
24	Кардіамін		-	87,9
25	Кетамін	7,5	-	99,3
26	Клозапін		Ac	85,8
27	Клонідин	8,2	Ac	73,2
28	Кодеїн	8,2	Ac	86,4
29	Кокаїн	8,7	-	88,8
30	Лідокаїн	7,9	-	96,0
31	Маркаїн(Бупівакаїн)	8,1	-	84,2

Продовження таблиці 2.1				
№з.п.	Назва речовини	pKa	Похідні	Ступінь виділення, %
32	Мебікар		-	94,5
33	Медазепам(Мезапам)	6,2	-	88,2
34	Мепробамат		-	80,2
35	Метамфетамін	9,9	Ac	68,1
36	Міансерин	7,1	-	83,1
37	Морфін	8;9,9	Ac	64,8
38	Нітразепам	3,4,10,8	-	70,6
39	Новокаїн(Прокаїн)	8,1	Ac	64,9
40	Оксспенолол	9,5	Ac	98,2
41	Папаверин	6,4	-	77,1
42	Пентобарбітал(Єстамінал)	8,0	Me	98,5
43	Промелод(Тримеперидін)		-	88,1
44	Пропранолол(Анаприлін)	9,5	Ac	94,6
45	Стрихнін	2,3;8	-	76,0
46	Супрастин(Галопірамін)		-	77,8
47	Тіаприд		-	57,5
48	Тізертцин(Левомепрамазін)	9,2	-	78,4
49	Тіопентал	7,5	Me	95,2
50	Тіоридазин	9,5	-	61,6
51	Трамадол	8,3	TMC	92,5
52	Тріоксазин		-	92,5
53	Феназапам		-	77,8
54	Фенобарбітал	7,4	Me	89,1
55	Фентаніл	8,4	-	79,8
56	Хінін	4;8,5	Ac	87,5
57	Хлордіазепоксид	4,6	-	69,8

Продовження таблиці 2.1				
№з.п.	Назва речовини	pKa	Похідні	Ступінь виділення, %
58	Хлорпротиксен	8,8	-	73,3
59	Циклобарбітал	7,6	Me	94,5
60	Циклодол(Трігексифеніділ)		-	87,1
61	Циннаризін		-	82,6
62	Єфедрін	9,6	Ac	89,2

З нашої точки зору, цього виділення цілком достатнього для проведення скринінгу. Праці у напрямку тестування методики і розширювання кола метаболітів зазначеним методом, будуть нами продовжені.

Таким чином, ми використовуємо наступну методику ізолювання з сечі наркотичних, лікарських речовин ті їх метаболітів.

Таблиця 2.2

Експериментальні ступені виділення з сечі деяких метаболітів гідроліза наркотичних та лікарських речовин

№з.п.	Назва речовини	Похідні	Ступінь виділення, %
1	2-аміно-5-хлорбензофенол(АХБ)	Ac	76,2
2	2-метиламіно-5-хлорбензофенол(МХБ)	Ac	84,0
3	2-аміно-5-бром-2-хлорбензофенон(АБХБ)	Ac	83,0
4	2-аміно-5-нітробензофенон(АНБ)	Ac	91,6
5	Дифенілметанол(продукт гідроліза дифенгідраміна)	Ac	89,5
6	1,1,5-триметил-4-феніл-пиперидил-4-ол(продукт гідроліза промедола)	Ac	74,1

Продовження таблиці 2.2			
№з.п.	Назва речовини	Похідні	Ступінь виділення, %
7	Нортриптилін	Ас	90,9
8	Амітриптилін-М(10-гідроксі-)	ТМС	88,0
9	Амітриптилін-М(нор, 10-гідроксі-)	ТМС	85,6
10	Іміпрамін-М(дезметил-)	Ас	58,2
11	Іміпрамін-М(гідроксі-)	Ас	93,4
12	Іміпрамін-М(дезметил,гідроксі-)	Ас	52,5
13	Клозапін-М(дезметил-)	Ас	60,1
14	Клозапін-М(гідроксі-)ізомер1	Ас	89,6
15	Клозапін-М(гідроксі-)ізомер2	Ас	82,3
16	Котинін	-	85,7
17	Левомепромазин-М(гідроксі-)	Ас	56,8
18	Метиекгонін(пр-т гідроліза кокаїна)	Ас	81,4
19	Міансерин-М	Ас	92,0
20	Пентоксифиллін-М(дегідро-)	-	84,8
21	Пентоксифиллін-М2	Ас	87,9
22	Тіаприд-М(О-дезметил-)	Ас	64,7
23	Трамадол-М(О-дезметил-)	ТМС	77,6
24	Трамадол-М(N-дидезметил-)	Ас	80,5
25	Трамадол-М(О,N-дидезметил-)	Ас	57,1
26	Фенобарбітал-М(гідроксі-)	Ас	80,9
27	Хлорпромазин-М(гідроксі-)	Ас	90,4

Примітка: тут і далі в таблицях літера-М після назви речовини означає його метаболіт

До 1мл сечі додається 50мкл розчину етилморфіна г/х(0,02г/л), 0,2мл концентрованої хлоридної кислоти, пляшка герметично закривається і розчин нагрівається на киплячому водяному грівнику протягом 30 хвилин. Після охолодження до кімнатної температури до проби додається 0,20мл 30% розчина гідроксиду натрія і біля 100мг гідрокарбоната натрія до утворення насиченого розчину. Перевіряється рН розчину на папері «Рифан»(рН повинно бути 8,4-8,6), і об'єкт екстрагується 5мл суміші хлороформ-ізобутанол(6:1). Суміш струшується 5 хвилин для перемішування і центрифугується із швидкістю 3000 обертів за хвилину на протязі 5 хвилин. Органічний екстракт пропускається крізь безводний сульфат натрія і випаровується струмом повітря при температурі не вище 40°C.

2.3 Дериватизація

Стадія дериватизації необхідна для аналізу сполук, які мають полярні групи –ОН і –NH. Збільшення полярних груп у сполуках спричиняє зменшення його летючості та чутливості, що викликає погіршення відтвореності газохроматографічного аналізу без стадії дериватизації. Зазвичай метаболіти більшості лікарських і наркотичних речовин мають одну або декілька полярних груп різної природи, це можуть бути первинні і вторинні амінні групи H_2NR і $HNRR^1$, які володіють основними властивостями різної сили, фенольні або спиртові гідроксигрупи –ОН, а також карбокси- та амідні групи, які проявляють кислотні властивості різної сили. Тому для їх аналізу у сечі після гідроліза край необхідна стадія дериватизації. Частіше за все для аналізу метаболітів застосовується ацетилювання оцтовим ангідридом в присутності основного каталізатора типу піридину або триетиламіну. При ацетилюванні відбувається етерифікація первинних і вторинних амінів, фенольних і спиртових –ОН груп за схемою, що наведена на рис.2.8.

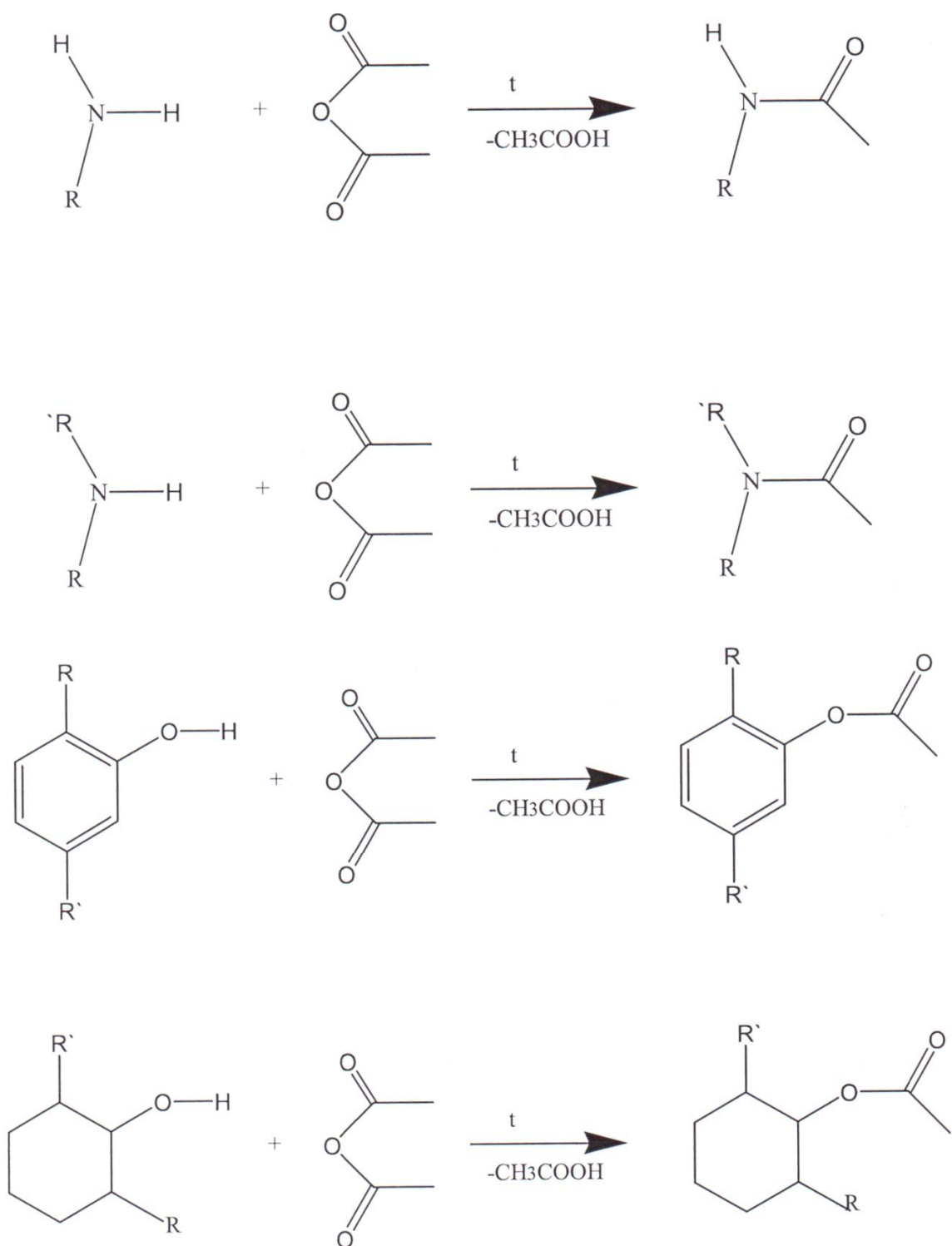


Рис.28.Схеми ацетилювання амінів, фенольних і спиртових гідроксильних груп.

Ацетилювання поряд із безумовними перевагами, такими як:

- дешевизна реактивів;
- стабільні деривати з добрими газохроматографічними властивостями:

- відсутність ефекта «звикання» колонки(як при аналізі ТМС похідних); володіє і деякими недоліками. Головним з них є можливість побічних реакцій віднімати воду у деяких сполук під дією сильного водовіднімаючого засобу- оцтового ангідриду. Це приводить до того, що із однієї сполуки з декількома –ОН групами може утворювати декілька дериватів із непостійною кількістю продуктів реакції. Наприклад, один з метаболітів трамадола(1-(3-метоксіфеніл)-2-(диметиламінометил)-гідроксіциклогексан-1-ол) має структуру, зображену на рис.2.9. Звичайно, не всі можливі продукти побічних реакцій одержуються на практиці у помітних кількостях, однак, при наявності значної кількості метаболітів у однієї сполуки або при вживанні декількох препаратів одночасно це явище істотно ускладнює ідентифікацію і знижую чутливість газохроматографічного аналізу. Можливість побічних реакцій при ацетилюванні необхідно враховувати при пошуку та ідентифікації метаболітів лікарських і наркотичних речовин на хроматограмі. Іншим недоліком ацетилювання є відсутність реакції з NH-групами кислотного характеру. Це не дає можливості закриття полярних груп в барбітуратах і деяких інших сполуках, які мають амідні групи. Зазвичай концентрації барбітуратів та інших сполук кислотного характеру в крові і сечі навіть при лікарській дозирівці достатньо велика, тому вони легко визначаються при скринінгі без дериватизації.

Алкилювання(метилування, етилювання або пропілювання) зазвичай застосовується для ідентифікації та кількісного аналізу речовин, які мають NH- та OH-групи кислотного характеру або карбоксильні групи[9,23,27,28], таких як барбітурати, канабіноїди, діуретини та інші.

Триметилсилільні ефіри дуже чутливі до вологи і не стабільні при зберіганні, крім того, введення реагентів для одержання ТМС ефірів до колонки газового хроматографа при аналізі веде до її «звикання» і після цього гостро погіршуються газохроматографічні характеристики. Колонки при аналізі інших дериватів та нативних лікарських речовин. Однак, маючи певні навички праці з триметилсилілюючими агентами і особливо при

спеціалізованих вузько спрямованих аналізах, коли на приладі виконуються аналізи тільки ТМС ефірів, із ними можливо ефективно працювати. Вони у більшості випадків мають «добрі» мас-спектри, що забезпечує високу чутливість аналізів.

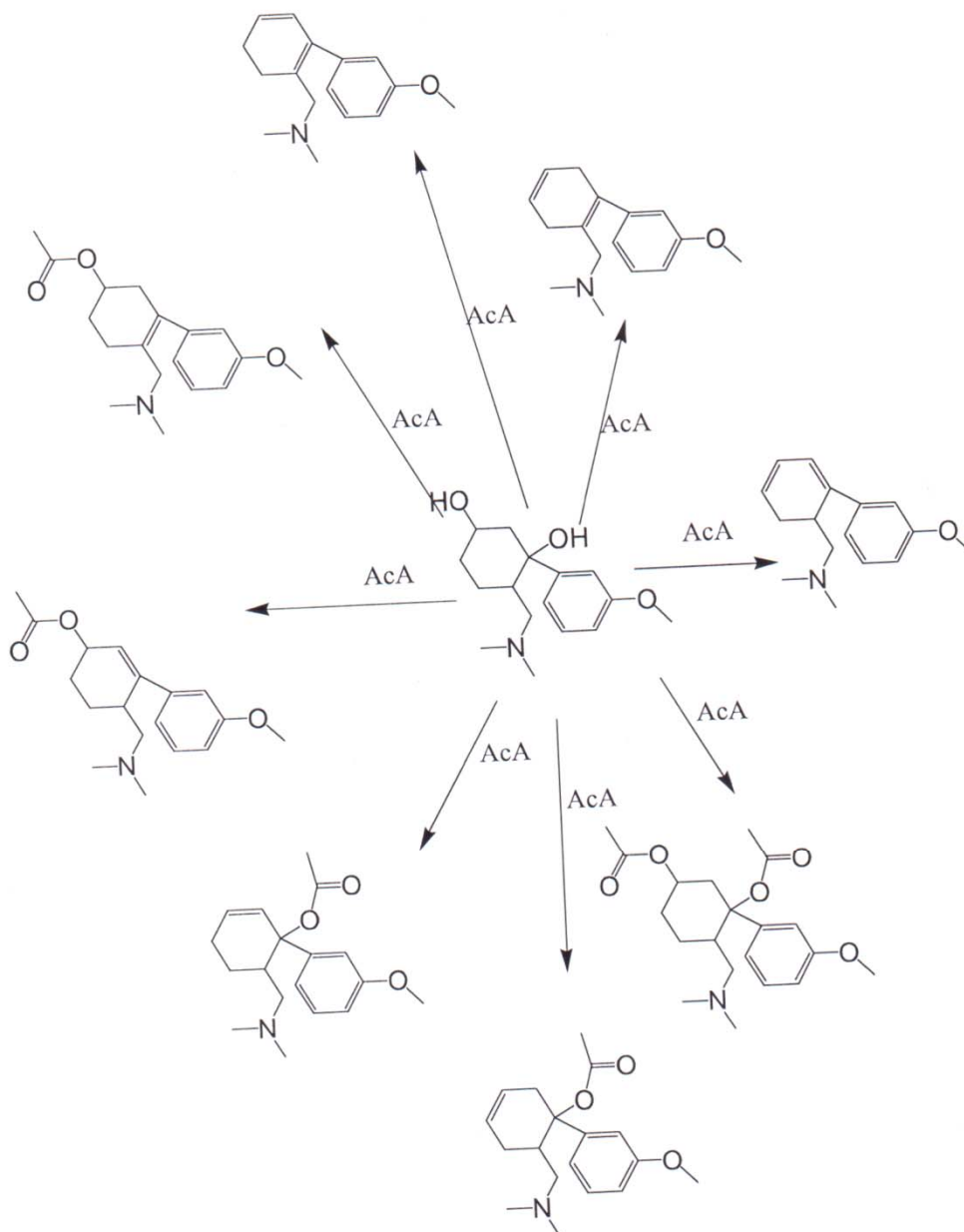


Рис.2.9. Схема можливих реакцій, які відбуваються при ацетилюванні 1-(3-метоксіфеніл)-2-(диметиламінометил)-гідроксициклогексан-1-ола(метаболіт трамадола)

Поліфторировані реагенти(трифтороцтовий, пентафторпропіоновий і гептафторолійний ангідриди) доволі дорогі і також відносно легко

гідролізуються, що обмежує їх застосування, крім того, для похідних цих реагентів у бібліотеках мас-спектрів існує дуже мало довідкових даних.

Слід також відзначити, що надлишок реагентів після ацетилювання (трифтор-, пентафтор- і гептафторацетилювання) необхідно ретельно видаляти, так як ці реагенти доволі реакційно здатні і можуть ушкодити рідинну фазу колонки та металеві частини мас-селективного детектора. Для цілей скринінгу ми використовуємо ацетилювання сумішшю оцтового ангідрида із безводним піридином, так як це один з самих простих і технологічних способів дериватизації, який не потребує особливих мір обережності і його переваги для серійних масових аналізів, на наш погляд, набагато перевершує його недоліки.

3. Газохроматографічний аналіз

Для скринінгу лікарських і наркотичних речовин зазвичай використовують капілярні колонки із неполярною або слабо полярною нерухомою рідинною фазою – 10% диметилсилоксан, 5% фенілдиметилсилоксан та іншим подібні [4]. Якщо для 100% диметилсилоксана (фаза типу HP-1 або Ultra-1) існують доволі значні хроматографічні бази даних [23,29], то для інших фаз відомості про індекси утримання відносно рідкісні та розрізнянні, що утримує їх використання для пошуку та ідентифікації лікарських речовин та їх метаболітів. Проте, індекси утримання для 100% диметилсилоксан і слабо полярних фаз типу HP-5 (Ultra-2, PAS-5, Rtx-5, XTI-5, MXT-5, DB-5, SE-54, SPB-5, RTE-5, SAC-5, AT-5, BP-5, BPX-5, OV-5, PE-2) добре корелюють між собою. Для розрахунку часу утримання на слабо полярних фазах сполук, для яких відомі індекси утримання на фазі HP-1, нами розроблена комп'ютерна програма на мові «Visual basic», яка розраховує орієнтовні години утримання для речовин, які нас цікавлять при наших конкретних газохроматографічних умовах.

3.1. Розрахунок часу утримання

Застосування метода розрахунку часу утримання ілюстровано нижче на прикладі одержання бази даних на колонці із фазою HP-5 довжиною 30

метрів, внутрішнім діаметром 0,25 мм з товщиною фази 0,25 мкм. Температурний режим : початкова температура на колонці 80 °С, яка підтримується 1 хвилину, потім нагрівання із швидкістю 40 град/хв. до 200°С і наступне нагрівання із швидкістю 12,5 град/хв. до 300°С із витримкою при кінцевій температурі 7 хвилин. Загальний час аналізу 18 хвилин, що дозволяє проводити аналіз 22-25 проб за зміну. Введення спроби без поділення потоку Split/Splitless із включенням дільника потоку через 1 хвилину. Газовий режим: газ—носії гелій, режим «constantFlow», початковий тиск на колонці 11 psi, об'ємна швидкість потоку 1,1 мл/хв., лінійна швидкість потоку – 39 см³/хв.. Напруження на електронному множильнику на 200 вольт вище Autotune. При даних умовах на газовому хроматографі HP-5890 серії II з мас-селективним детектором HP-5972 проаналізовані метанольні розчини, які вміщують по 0,05-0,1 г/л наркотичних та лікарських речовин. Ці тестові суміші вибрані у якості калібрувальних. Для кожної речовини у цих сумішах відомі індекси утримання на неполярній фазі, які були нами використані з наукової статті [29], бажано у якості реперних використовувати речовини, індекси утримання яких рівномірно розподіленні від найменшого значення до найбільшого. Індекси утримання, окрім [23], однак в монографії «Clarke`sisolation...» база даних менша, ніж в бібліотеці мас спектрів PMW –TOX2, вона обмежена нативними сполуками і не вміщують індексів утримання метаболітів та їх похідних. В таблиці 3.1 наведені данні за часом утримання, одержані при аналізі тестових сумішей при газохроматографічних умовах, описаних вище. Програма на мові «Visial basic» використовує данні по індексам утримання і часу виходу, які знаходяться в електронних таблицях в форматі XLS, розраховую за ними рівняння і часом виходу у вигляді полінома n-ного ступеня вигляду $\tau = \sum A_i * RI^n$, де τ – час виходу сполуки при даних газохроматографічних умовах, A_i – коефіцієнти полінома, а RI – індекси утримання на фазі типу HP-1 (100% диметилсилоксан). Програма розраховує також помилку апроксимації (середньоквадратичне відхилення - СКВ) для розрахунку довірчого інтервалу

за часом утримання, у середині якого із неймовірністю 95% знаходиться справжній час утримання.

За звичай найменша помилка апроксимації для описаних умов хроматографування одержується для ступеня полінома, який дорівнює чотирьом. Для даних

Таблиця 3.1.

Фрагмент хроматографічної бази даних для одержання рівняння зв'язку між індексами утримання і часом виходу.

№ з.п.	Назва сполуки	Параметри утримання	
		Індекс	Час, хв.
1	Диметилформамід	1000	3,02
2	Нафталін	1190	3,62
3	Ефедрин	1375	4,34
4	Барбітал	1500	4,8
5	Амобарбітал (Барбаміл)	1710	5,7
6	Промедол	1810	6,27
7	Димедрол (Дифенгідрамін)	1870	6,45
8	Фенобарбітал	1965	7,02
9	Прокаїн (новокаїн)	2025	7,37
10	АХБ	2050	7,49
11	МХБ	2100	7,8
12	Амітриптилін	2205	8,44
13	Медазепам	2235	8,75
14	Дипразин (Прометазин)	2270	8,92
15	Карбамазепін	2285	9,2
16	Кодеїн	2375	9,67
17	Пентоксифелін	2435	10,02
18	Аміназин (Хлорпромазин)	2500	10,29
19	Тизерцин	2540	10,4

	(Левомепромазин)		
20	Хлороквін	2595	10,89
21	Фентаніл	2720	11,55
22	Нитразепам	2760	11,86
23	Папаверин	2820	12,23
24	Клозапін (Лепонекс)	2895	12,52
25	Галоперидол	2940	13,3
26	Циннаризин	3040	13,86
27	Тіоридазин	3125	14,37
28	Стрихнін	3140	14,5
29	Верапаміл	3150	14,65
30	Верошпірон	3240	15,54
31	Неулептил (Перициазин)	3265	15,95

з таблиці 3.1 із допомогою електронної програми одержано рівняння зв'язку виду:

$$\tau_{(хв.)} = 10,37 - 0,0197 \cdot RI + 1,70 \cdot 10^{-5} \cdot RI^2 - 5,15 \cdot 10^{-9} \cdot RI^3 + 5,94 \cdot 10^{-15} \cdot RI^4$$

із СКВ, який дорівнює 0,126 хв. На рис. 3.1. графічно представлені данні, що наведені в табл.3.1., а також крива апроксиміруючої залежності.

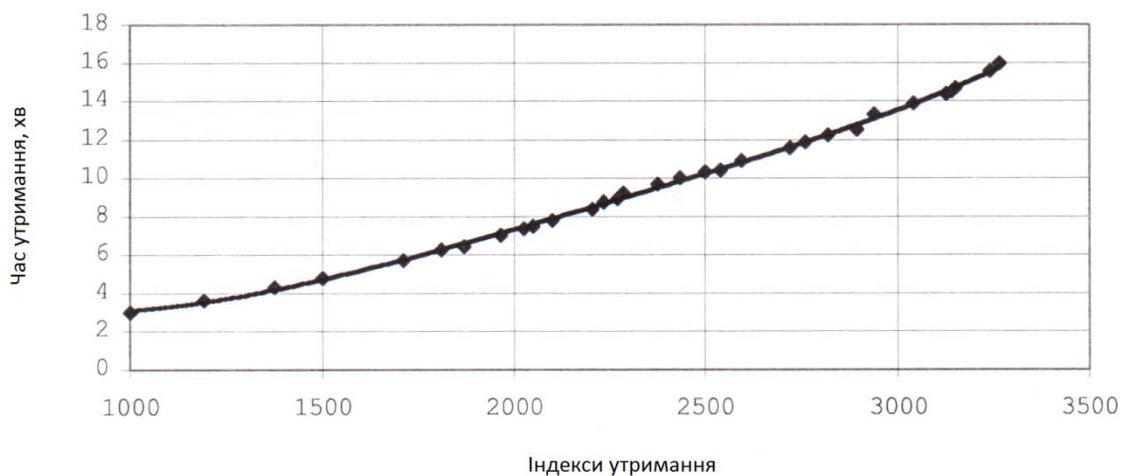


Рис.3.1. Експериментальні данні утримання індексів газохроматографічного визначення аналізованих речовин.

Одержання рівняння апроксимації використовується для розрахунку часу утримання усіх досліджуваних наркотичних, лікарських речовин, їх метаболітів і дериватів з відомими індексами утримання для фази типу НР-1. В теперішній час у нашій хроматографічній базі даних більш як 500 сполук (нативні речовини, метаболіти та їх деривати), які ми зобов'язані контролювати, або які ідентифіковані у проведених раніше експертизах. Для усіх сполук, які включені до бази даних, програма автоматично розраховує час утримання для діючих умов хроматографування, окрім того програма виконує і зворотній розрахунок, коли відомий час утримання речовини,

Таблиця 3.2.

Фрагмент хроматографічної бази даних з розрахованими та експериментальними годинами утримання деяких сполук.

№ з.п	Назва сполук	Індекс утримання	Час утримання, хв	
			Розрахунок	Експеримент
1	Никотин	1380	4,18	4,22
2	Кардінамін (Никетамід)	1535	4,86	4,93
3	Амобарбітал-2 Ме	1595	5,14	5,16
4	Метилекгонін Ас	1595	5,14	5,19
5	Ібупрофен	1615	5,24	5,20
6	Пентабарбітал -2 Ме	1630	5,32	5,28
7	Димедрол НУ Ас	1700	5,67	5,65
8	Парацетамол Ас	1770	6,03	6,07
9	Гексабарбітал-Ме	1805	6,22	6,16
10	Пентобарбітал-М (ОН-) 2Ме	1820	6,30	6,15
11	Кетамін	1835	6,38	6,43
12	Тіопентал	1835	6,48	6,47
13	Фенобарбітал-2 Ме	1860	6,51	6,37
14	Лідокаїн	1875	6,59	6,57

Продовження таблиці 3.2.				
№ з.п	Назва сполук	Індекс утримання	Час утримання, хв	
			Розрахунок	Експеримент
15	Амідопирин	1895	6,70	6,81
16	Доксиламін	1920	6,84	6,75
17	Трамадол	1945	6,97	6,99
18	Трамадол-М (О-дзметил-) Н ₂ О Ас	2000	7,27	7,08
19	Циклизін	2045	7,52	7,45
20	Трамадол-М (О-дезметил-)) Ас	2080	7,72	7,59
21	Атропін-Н ₂ О	2085	7,74	7,63
22	Клофелін (Клонідин)	2090	7,77	7,88
23	Диклофенак- Н ₂ О	2135	8,02	8,04
24	Метадон	2160	8,16	8,05
25	Пропранолол	2160	8,16	8,16
26	Кетамін-Ас	2170	8,22	8,29
27	Галопірамін (Супрастин)	2190	8,33	8,28
28	Диклофенак-Ме	2195	8,36	8,32
29	Етофілін-Ас	2200	8,39	8,29
30	Міансерин	2210	8,44	8,60
31	Адифенін	2215	8,47	8,38
32	Атропін	2215	8,47	8,47
33	АХБ-Ас	2245	8,64	8,6
34	Циклодол (Тригексифенідил)	2250	8,67	8,85
35	Нортриптилін	2255	8,70	8,61
36	Триоксазин (Триметозин)	2260	8,73	8,71
37	МХБ-Ас	2260	8,73	8,7

Продовження таблиці 3.2.				
№ з.п	Назва сполук	Індекс утримання	Час утримання, хв	
			Розрахунок	Експеримент
38	Маркаїн (Бупивакаїн)	2260	8,73	8,85
39	Метамізол-М Ас	2270	8,78	8,86
40	Карбамезепін	2285	8,87	9,1
41	Тетрагідроканнабінол Ме	2360	9,29	9,35
42	Фенобарбітал-М(ОН-) Ас	2360	9,29	9,55
43	Бромгексин	2375	9,38	9,56
44	Каннабідіол	2400	9,52	9,5
45	Диазепам	2430	9,70	9,91
46	Дизопірамид	2490	10,05	10,18
47	3-Моноацетилморфін	2500	10,10	10,41
48	Кодеїн-Ас	2500	10,10	10,33
49	Пентоксифілін-М (дигідро)	2505	10,13	10,1
50	Хлорпротиксен	2510	10,16	10,29
51	6-моноацетилморфін	2535	10,31	10,48
52	Каннабінол-Ас	2540	10,34	10,18
53	Каннабінол	2555	10,43	10,52
54	Міансерин-М (Но-) Ас	2580	10,58	10,92
55	Алімемазин-М (ОН-) Ас	2600	10,70	10,95
56	Пропанолол 2Ас	2605	10,73	10,76
57	Героїн	2620	10,82	11,08
58	Трифтазин	2690	11,25	11,4
59	Налоксон	2715	11,40	11,39
60	Клозапін Ас	2870	12,41	12,36
61	Морфін –М (нор-) 3Ас	2960	13,04	13,3

Продовження таблиці 3.2.				
№ з.п	Назва сполук	Індекс утримання	Час утримання, хв	
			Розрахунок	Експеримент
62	Хлорпромазин-М (біснор-) Ас	2990	13,26	12,99
63	Клозапін-М (ОН-) Ас	3050	13,71	14,26
64	Клозапін-М (нор-) 2Ас	3490	17,88	17,3

але невідомий його індекс утримання. Розрахунковий індекс утримання, який ми одержуємо у другому випадку, строго кажучи, не може бути використаний як довідковий для фази НР-1, але він може бути використаний для розрахунку часу утримання на фазі типу НР-5 при газохроматографічних умовах (інші розміри колонки, газовий та температурний режими). В таблиці 3.2. наведено фрагмент бази даних, де для порівняння наведені розрахований та експериментальний час утримання для деяких сполук, які ідентифіковані у зразках після одержання апроксимуючого рівняння і розрахунку за ним передбачуваний час утримання цих сполук. Видно, що в інтервалі часу утримання від 3 до 13,5 хв. ($RI=1000-3000$) рівняння розраховує час утримання із припустимою точністю, так як помилка визначення часів утримання не перевищує $\pm 3\text{СКВ}$, тобто $\pm 0,38\text{хв}$. Найбільші помилки апроксимації спостерігаються для високих значень індекси утримання або часу утримання вище 13,4хв. Це може бути пов'язано з помилками екстракції (у цьому часовому інтервалі рівняння працює в режимі екстраполяції, так як реперних точок з індексом утримання вище 3000 дуже мало), так із невеликою точністю визначення індекса утримання у цьому інтервалі значень RI . Виходячи з вищезазначеного, для надійного виявлення досліджуваних нами лікарських речовин, їх метаболітів і дериватів із розрахованим часом утримання до 13 хвилин нами використовується часове вікно $\pm 0,4\text{хв}$, а для часу утримання вище 13 хвилин $\pm 0,6\text{хв}$.

В таблиці 3.3 наведені індекси утримання, які одержані зворотнім розрахунком за наведеною вище схемою, для деяких лікарських речовин, їх метаболітів і дериватів, відомості про яких

Таблиця 3.3.

Розраховані індекси утримання для деяких лікарських речовин, їх метаболітів і дериватів

Назва сполуки	Параметри утримання		Характеристичні іони		
	Час, хв.	Розрахунковий індекс	mz1	mz2	mz3
ГОМК- Н ₂ O (бутиролактон)	3,21	1065	86	56	85
Амфетамін – PFP	3,95	1280	119	257	190
Триетиленгліколь	4,06	1310	45	89	58
Ефедрин - TFA	4,71	1475	154	110	117
Кардіамін-М (Дезалкіл-)	4,71	1475	106	149	78
Анабазін	4,73	1480	133	162	163
1,2,5-триметил- 4фенилпіперидил-4-ол (продукт гідроліза промедола)	4,95	1530	186	201	224
МДА – PFP	5,19	1585	135	162	325
МДА – TFA	5,25	1600	135	162	275
Ізоніазид TFA	5,6	1675	106	78	233
МДМА TFA	5,75	1705	154	162	289
1,2,5-триметил- 4фенилпіперидил-4-ол (продукт гідроліза промедола) Ac	5,88	1730	186	201	261

Продовження таблиці 3.3.

Назва сполуки	Параметри утримання		Характеристичні іони		
	Час, хв.	Розрахунковий індекс	mz1	mz2	mz3
Трамадол-М (N – дезиметил-) - H ₂ O Ac	6,63	1875	258	58	273
МДЕА – «EVE»	6,63	1875	162	91	119
Мебікар	6,66	1880	112	198	126
МДЕА PFP	6,68	1885	277	292	162
Пентобарбітал-М 2Me	6,69	1885	169	184	225
МДЕА TFA	6,69	1885	277	292	162
Теофілін – Pr	6,74	1895	180	222	193
Клонідин 2Me	6,76	1900	222	257	224
Анабазин Ac	6,80	1905	161	133	203
Оксспренолол 2TFA	6,88	1920	266	308	457
Клонідин Me	7,01	1945	208	243	210
Клонідин Pr	7,08	1955	229	231	236
Трамадол Ac	7,22	1980	58	188	305
Клонідин 2Pr	7,36	2005	194	236	278
Ефедрин 2Bu	7,57	2040	58	128	148
Атропін TFA	7,65	2055	124	140	385
Атропін PFP	7,71	2065	124	64	435
Трамадол-М (O- дезметил-) 2Ac	7,80	2080	58	174	303
Канабідіол PFP	7,90	2097	377	460	417
9-тетрагідроканабіно PFP	7,98	2110	445	417	460
Дибазол	7,98	2110	207	208	103

Продовження таблиці 3.3.

Назва сполуки	Параметри утримання		Характеристичні іони		
	Час, хв.	Розрахунковий індекс	mz1	mz2	mz3
2-аміно-5-нітробензофенон PFP	8,01	2115	191	269	388
2-аміно-5-бром-2-хлорбензофенон TFA	8,07	2125	388	386	368
2-аміно-5-нітробензофенон TFA	8,19	2145	388	269	308
Канабінол PFP	8,32	2165	441	442	456
Трамадол-М (ОН-) 2Ac	8,50	2195	58	174	363
Диклофенак-М (ОН-)	8,53	2200	231	233	246
Амітриптилін-М (нор, ОН-) - H ₂ O TFA	8,56	2205	231	230	357
2-аміно-5-хлорбензофено Bu	8,60	2210	254	282	256
Диклофенак-М (ОН-) Me	8,65	2220	243	258	295
Кетамін-М (нор-) Bu	8,78	2240	202	152	208
Морфін 2HFB	8,84	2250	464	677	465
МДЕА Ac	8,91	2260	91	162	204
Пропранолол 2TFA	8,94	2265	266	308	152
Клонідин Bu	9,06	2285	194	230	284
Оксспренолол 2Ac	9,06	2285	200	98	201
Етилморфін TFA	9,09	2290	296	409	380
Кодеїн HFB	9,10	2290	282	495	283
Метоклопрамід – TFA	9,27	2320	86	280	323
Кетамін Bu	9,28	2320	180	244	236

Продовження таблиці 3.3.

Назва сполуки	Параметри утримання		Характеристичні іони		
	Час, хв.	Розрахунковий індекс	mz1	mz2	mz3
Етилморфін HFB	9,31	2325	296	509	297
Етилморфін PFP	9,39	2340	296	459	297
Трамадол-М (N – дезиметил-) - H ₂ O 2Ac	9,47	2350	116	331	228
6-моноацетилморфін TFA	9,56	2365	364	423	380
Амітриптилін-М (нор-) TFA	9,62	2375	232	217	359
2-аміно-5-бром-2-хлорбензофенон TFA	9,72	2390	274	311	353
Клонидін - PFB	9,90	2420	354	356	389
Атропін Вu	9,91	2420	124	359	140
Хлорпромазин-М (нор-)	10,47	2510	44	304	233
Галопирамін-М (ОН-)	10,56	2525	58	125	247
Кодеїн Pro	10,87	2575	355	282	229
Хлорпромазин-М (нор-, ОН-) 2Ac	10,97	2590	232	333	335
Клозапін PFP	11,00	2595	402	373	415
Етилморфін Pro	11,06	2605	369	296	340
Кодеїн Вu	11,21	2630	369	282	222
Хлорпромазин-М (ОН-) ізомер 2Ac	11,24	2635	58	291	376
Клозапін TFA	11,25	2635	352	323	365
Феназепам	11,52	2680	350	321	348

Продовження таблиці 3.3.					
Назва сполуки	Параметри утримання		Характеристичні іони		
	Час, хв.	Розрахунковий індекс	mz1	mz2	mz3
Етилморфін Вu	11,60	2694	383	296	354
Фтивазид	11,87	2740	149	78	271
6-моноацетилморфін Вu	11,88	2740	327	397	268
Клозапін-М (нор-) 2 TFA	12,08	2775	352	504	407
Морфін 2Pro	12,09	2775	341	397	324
Хлорпромазин-М (ОН-) ізомер 3Ac	12,11	2780	58	376	288
Дротаверин	12,26	2805	396	368	397
Клозапін - Pro	12,82	2900	312	325	382
Клозапін - Вu	12,94	2920	326	339	328
Морфін 2Вu	13,00	2930	355	268	425
Фенолфталеїн 2Me	13,11	2950	271	302	346
Хлорпромазин-М (2 ОН-) 2Ac	14,94	3275	58	433	392

відсутні у базах даних [23,29]. В таблиці 3.3 також наведено по три характеристичних іонів для кожної сполуки, що дозволяє використовувати ці дані для ідентифікації сполук на хроматографах. Паралельно нами створюється база даних за індексами утримання на фазі HP-5 (5% фенілдиметилсилоксан), так як ця фаза найбільш часто використовується для хіміко-токсикологічного аналізу.

В таблиці 1 додатка наведені дані за індексами утримання (по Н-алканам) на фазі HP-5 (5% фенілдиметилсилоксан), які визначені нами протягом останнього часу, однак цих даних ще не вистачає для

повномасштабного їх використання при розрахунках часу утримання. По мірі поповнення банку даних індексів утримання на фазі НР-5 як власних даних, так і літературних ми плануємо повністю проводити розрахунки часу утримання за індексами за цієї фази.

Тести для самоконтролю

1. Максимальное количество морфина экстрагируются хлороформом при рН равном:

A 8,6-10,2

B 1,6-3,2

C 12,5-14

D 4,4-6,5

E 7,2-8,0

2. Укажите, какому процессу подвергается морфин при метаболизме в организме человека:

A N-деметилованию

B аминированию

C дезаминированию

D восстановлению

E всё указанное не верно

3. При экстрагировании морфина водой из биологического материала используется кислота:

A сульфатная

B цитратная

C нитратная

D тартратная

E хлоридная

4. Укажите кислоты, которые используются при выполнении реакции Пеллагри для обнаружения морфина:

А хлоридная и сульфатная

В хлоридная и нитратная

С сульфатная и нитратная

Д хлоридная и нитритная

Е все ответы верны

5. Кроме морфина положительную реакцию Пеллагри также дает:

А кодеин

В этилморфин

С диацетил морфин

Д апоморфин

Е все ответы верны

6. Укажите окраску, возникающую в результате взаимодействия морфина с раствором феррум (III) хлорида:

А синяя

В красная

С зеленая

Д желтая

Е фиолетовая

7. Укажите окраску, возникающую в результате взаимодействия морфина с раствором калий (III) гексацианоферрата:

А синяя

В красная

С зеленая

Д желтая

Е фиолетовая

8. Укажите систему растворителей, которая используется для обнаружения морфина методом тонкослойной хроматографии:

А эфир-ацетон-25% р-р аммиака

В хлороформ-ацетон-диэтиламин

С бутанол-кислота ацетатная-вода

Д ацетон-эфир

Е изопропанол-диэтиламин-толуол

9. Укажите окраску, возникающую в результате взаимодействия морфина с реактивом Марки:

А сине-фиолетовая

В красная

С жёлто-зеленая

Д желтая

Е голубая

10. Кодеин является:

А монометиловым эфиром морфина

В диацетил морфином

С моноацетил морфином

Д моноэтиловым эфиром морфина

Е все ответы не верны

11. Произошло отравление опиумом. При исследовании «щелочного» хлороформного экстракта необходимо учесть, что в процессе биотрансформации кодеина одним из продуктов метаболизма является:

А Морфин

В Тебаин

С Героин

D Этилморфин

E Папаверин

12. Укажите, какому процессу подвергается кодеин при метаболизме в организме человека:

A O-деметилованию

B аминированию

C окислению

D гидроксированию

E всё указанное не верно

13. Укажите окраску, возникающую в результате взаимодействия кодеина с 0,5% раствором аммоний ванадата и 2% раствором кислоты сульфатной:

A зеленая переходящая в синюю

B красная переходящая в зеленую

C синяя переходящая в зеленую

D желтая переходящая в красную

E фиолетовая переходящая в желтую

14. Укажите систему растворителей, которая используется для обнаружения кодеина методом тонкослойной хроматографии:

A хлороформ-ацетон-диэтиламин

B эфир-ацетон-25% р-р аммиака

C бутанол-кислота ацетатная-вода

D ацетон-эфир

E изопропанол-диэтиламин-толуол

15. Укажите отличительную реакцию морфина от кодеина:

A с феррум (III) хлоридом

B реакцией Пеллагри

- C с реактивом Марки
- D с реактивом Фреде
- E все ответы не верны

16. Морфин можно определить по поглощению света в УФ-области спектра. При какой длине волны раствор морфина имеет максимум поглощения в спирте этиловом:

- A 287 нм
- B 284 нм
- C 281 нм
- D 255 нм
- E 218 и 260 нм

17. При использовании реактива Манделина для выявления дионина реакция считается позитивной при возникновении:

- A зеленого окрашивания
- B сине-зеленого окрашивания
- C фиолетового окрашивания
- D сине-фиолетового окрашивания
- E красного окрашивания

18. Использование реактива Фреде при выявлении алкалоидов привело к образованию стойкого фиолетового окрашивания. Это может свидетельствовать о наличии в биоматериале:

- A Морфина
- B Апоморфина
- C Бруцина
- D Кодеина
- E Папаверина

19. Для выделения морфина из биологического материала используются методы, которые базируются на изолировании его:

А Этанолом, подкисленным кислотой оксалатной

В Настаиванием с водой

С Минерализацией биологического материала

Д Перегонкой с водяным паром

Е Этанолом, подкисленным хлоридной кислотой

20. Основным механизмом биотрансформации папаверина является:

А О-деметилирование

В N-метилирование

С О-метилирование

Д ацетилирование

Е. Гидроксилирование

21. Отличить опиум от опиона позволяет химико-токсикологическое исследование на наличие:

А меконина

В морфина

С папаверина

Д тебаина

Е наркотина

22. Исследование на наличие наркотина производят в тех случаях, если в вытяжках с биологического материала обнаружен:

А морфин

В конииин

С никотин

Д ареколин

Е атропин

23. Экспресс-тестирование исследуемой пробы на наличие опия проводят:

А реактивом Марки

В концентрированной кислотой сульфатной

С коцентрированной кислотой хлорной

Д раствором прочного синего Б

Е раствором калий йодида

24. Героин при попадании в организм преимущественно метаболизируется до:

А морфина и 6-моноацетилморфина

В кодеина

С морфина

Д 6-ацетилморфина

Е 3-ацетилморфина и морфина

25. Произошло отравление алкалоидами опия. Как химически доказать, что отравление вызвано опиумом, а не морфином? Провести реакцию на:

А меконовую кислоту

В троповую кислоту

С салициловую кислоту

Д кислоту ацетатную

Е кислоту хлоридную

3.2. Пошук цільових сполук на хроматограмах

Після хроматогування дериватизованого екстракта сечі автоматично включається бібліотечний пошук за довідковими мас-спектрами. Нами використовується наступна стратегія пошука:

- спочатку відбувається пошук мас-спектрів по особистій бібліотеці із вірогідністю спів падання не нижче 90%. В теперішній час в особистій

бібліотеці знаходиться 380 довідкових мас-спектрів лікарських, наркотичних речовин та їх дериватів, які були ідентифіковані в процесі виконання експертиз;

- далі виконується пошук за спеціальною токсикологічною бібліотекою PMW-TOX2.L із вірогідністю спів падання не нижче 50%;
- і далі пошук по бібліотеці WILEY275.L або NBS75K.L.

При значних концентраціях наркотичних речовин та їх метаболітів у сечі в рапорті бібліотечного пошуку окрім натічного лікарського або наркотичного засобу присутні, у більшості випадків, декілька дериватів його метаболітів. Однак, не завжди бібліотечний пошук ефективно визначає аналізовані речовини, так як в екстракті гідролізованої сечі присутні доволі багато ендогенних речовин, які дають значний фон на хроматографі, що перешкоджає бібліотечний пошук. Для надійної фіксації наявності в сечі наркотичних сильнодіючих лікарських речовин та їх метаболітів край необхідним є цільовий пошук зазначених речовин. MaurerН.Н. у працях [4,7,11] пропонує проводити цільовий пошук аналізованих речовин за груповими характеристичними іонами на всій хроматограмі. Для цього зазначений автор пропонує декілька наборів групових іонів для пошуку ліків наркотичних, лікарських препаратів, їх метаболітів та дериватів на хроматограмі гідролізованої сечі. Однак використання групових іонів передбачає, що у нашому розпорядженні є певні данні по мас-спектрам і індексам утримання усіх метаболітів наркотичних та лікарських речовин та їх дериватів. Для лікарських речовин, які розповсюджені у Європі, MaurerН.Н. із співробітниками створили доволі значну базу даних мас-спектрів електронного вдару та індексів утримання[29], однак у вітчизняній практиці застосовуються деякі сильнодіючі речовини, які не використовуються у Європі. Окрім того, ми при використанні особистої методики пробо підготовки сечі для скринінга іноді ідентифікуємо похідні метаболітів деяких речовин, які відсутні у базі даних[29], тому ми на тепер не маємо можливості повністю використовувати методику пошуку за груповими

іонами, яка запропонована Maurer Н.Н. Для використання цієї методики необхідно провести додаткові дослідження для перевірки її надійності при ідентифікації метаболітів специфічних вітчизняних препаратів і поширити коло похідних метаболітів лікарських і наркотичних речовин, які найбільш часто використовуються у лікарській практиці.

Для цільового пошуку певного кола лікарських та наркотичних речовин, які найбільш часто використовуються, нами застосовується візуальний пошук за характеристичними іонами для кожного із аналізованих речовин у певному часовому проміжку. Після проведення підготовчої роботи за розрахунками апроксимуючого рівняння та передбачаємих часовому інтервалі утримання для пошуку ліків, сполук які ми контролюємо, нами використовується макрокоманди. Макрокоманди малюють у вікнах паралельного аналізу для кожної аналізованої сполуки(наркотичного, лікарського засобу, їх метаболітів та дериватів) хроматограми за характеристичними іонами у певному часовому вікні. Ці хроматограми використовуються для візуального пошуку цільових сполук. Часове вікно пошуку визначається як за часом утримання, яка описана вище, плюс-мінус $3 \cdot \text{СКВ}$. Для описаного вище випадку вікно пошуку складає при часі утримання до 13 хвилин $\pm 0,4$ хв., а для часу утримання вище 13 хвилин $\pm 0,6$ хв. Якщо відомий реальний, а не розрахований час утримання для даної сполуки, то при складанні макрокоманд враховується реальний час утримання і вікно пошуку може бути зменшено. Слід зазначити, що колонка, яка знову встановлюється на хроматографі колонка калібрується за допомогою калібрувальних сумішей(див.табл.3.1). Щоби не втратити реальні данні за часом утримання на старій(знятій з хроматографа) колонці, рекомендується зміною тиска в інжекторі хроматографа під коректувати час утримання на новій колонці сполук, які входять до калібрувальної суміші, так, щоби вони були максимально близькі до термінів утримання цих же сполук на використаній вже колонці. У цьому випадку можна використовувати у подальшому хроматографічну базу даних, одержаній на старій колонці.

Окрім того, при роботі на даній колонці банк даних за часом утримання постійно поповнюється і для уточнення апроксимуючого рівняння рекомендовано періодично проводити перерахунок часу утримання, додаючи до розрахунку у якості реперних точок увесь набір даних за часом утримання, який одержується на даний момент часу. Ця процедура, як завжди, покращує точність передбачення часу утримання для подальшого використання при пошуку піків за макрокомандою.

У якості приклада, у додатку 2 наведено текст макрокоманди для пошуку деяких наркотичних речовин, їх метаболітів та ацетильованих дериватів. Написані у «Блокноті» макрокоманди слід розмістити до директорії «Hrchem/Msexh»(тут і далі наведені назви для варіанта програмного забезпечення HPG1034CMSChemStation). Виклик макрокоманд відбувається з паралельного аналізу(StandaloneDataAnalysis) набором у командному рядку(CommandLine) ім'ям файла у якому знаходяться макрокоманди, у нашому випадку macro"narcl.mac."(див.Додаток 2). Після завантаження до оперативної пам'яті машини файла, де знаходяться макрокоманди, окремі макрокоманди можливо викликати набором у командному рядку ім'я макрокоманди, у нашому випадку asu11. Наведена у додатку 2 макрокоманда після її запуску набором ім'я asu11 і натискання клавіші Enter заповнити зазначений файл із хроматограмою, розмістити його у регістрі RO стекової пам'яті, і прописує у вікнах 5-16 паралельного аналізу реконструйовані хроматографи за вибраними іонами, які вказані у рядку(наприклад для вікна 5):

Chrtlow:thigh,86,118,177 від часу, зазначеного у рядку tlow=4,4 до часу, який зазначений у рядку thigh=5,2,проінтегрує хроматографу за допомогою додаткової підпрограми INI із ступенем 10 одиниць і розмістити у вікні(приклад 5) напис, яка буде вказана у рядку annotate 5,0,ii,t, «Амфетамін Ас» у дужках «Амфетамін Ас». Макрокоманда помістить кожен з реконструйованих хроматограф до регістру стекової пам'яті R1-R9,X,Y,Z,для того щоби їх можливо було би у подальшому проаналізувати до введення

нової макрокоманди. Кількість вікон у кожній команді дорівнює 12 і обмежено об'ємом стекової пам'яті. Після того, як макрокоманда розміщена у вікнах 5-16 паралельного аналізу реконструйовані хроматограми, їх необхідно візуально оцінити. Про можливу присутність у пробі аналізованої сполуки сигналізує наявність у відповідному вікні трьох піків із одним часом утримання і характерними іонними співвідношеннями. Як завжди, до рядка, який заповнений характеристичними іонами m/z : 86, 118, 177 першим включається самий інтенсивний іон і далі у порядку зменшення інтенсивності. Це допомагає у подальшому при швидкій візуальній ідентифікації наявності сигналу або, що важливіше, при його відсутності. На рис.3.2 наведені хроматограми за характеристичними іонами, які відповідають позитивному сигналу на Морфін 2Ас-0,6мкг/мл морфіна(рис.3.2-а) і відсутності сигналу(рис.3.2-в). При цьому самий інтенсивний іон героїна 327 має самий високий пік і малюється на хроматограмі білою лінією(програмове забезпечення HP 61034 CMSChemstation), менш інтенсивний 369 іон малює зеленою лінією, а сигнал іона 310-жовтою. Слід відзначити, що наявність позитивного сигналу на хроматограмі за характеристичними іонами ще не дає гарантії вірної ідентифікації сполуки. Кінцева ідентифікація повинна бути проведена порівнянням одержаного повного мас-спектра із довідковим. Інший варіант ідентифікації-це аналіз у режимі за характеристичними іонами(SIM) спочатку «стандартною» біорідиною із відомим вмістом аналізованої речовини, потім «холостої» біорідини для перевірки відсутності сигналу без аналізованої речовини і, на кінець, аналіз досліджуваної біорідини, при чому час утримання аналізу в межах помилки експерименту (зазвичай не більше $\pm 2\%$) в «стандартній» біорідині та аналізованої повинні співпадати, а співвідношення сигналів, що підтверджують іони у «стандартній» та аналізованій біорідині не повинні відрізнятись більш ніж на 20%[32].

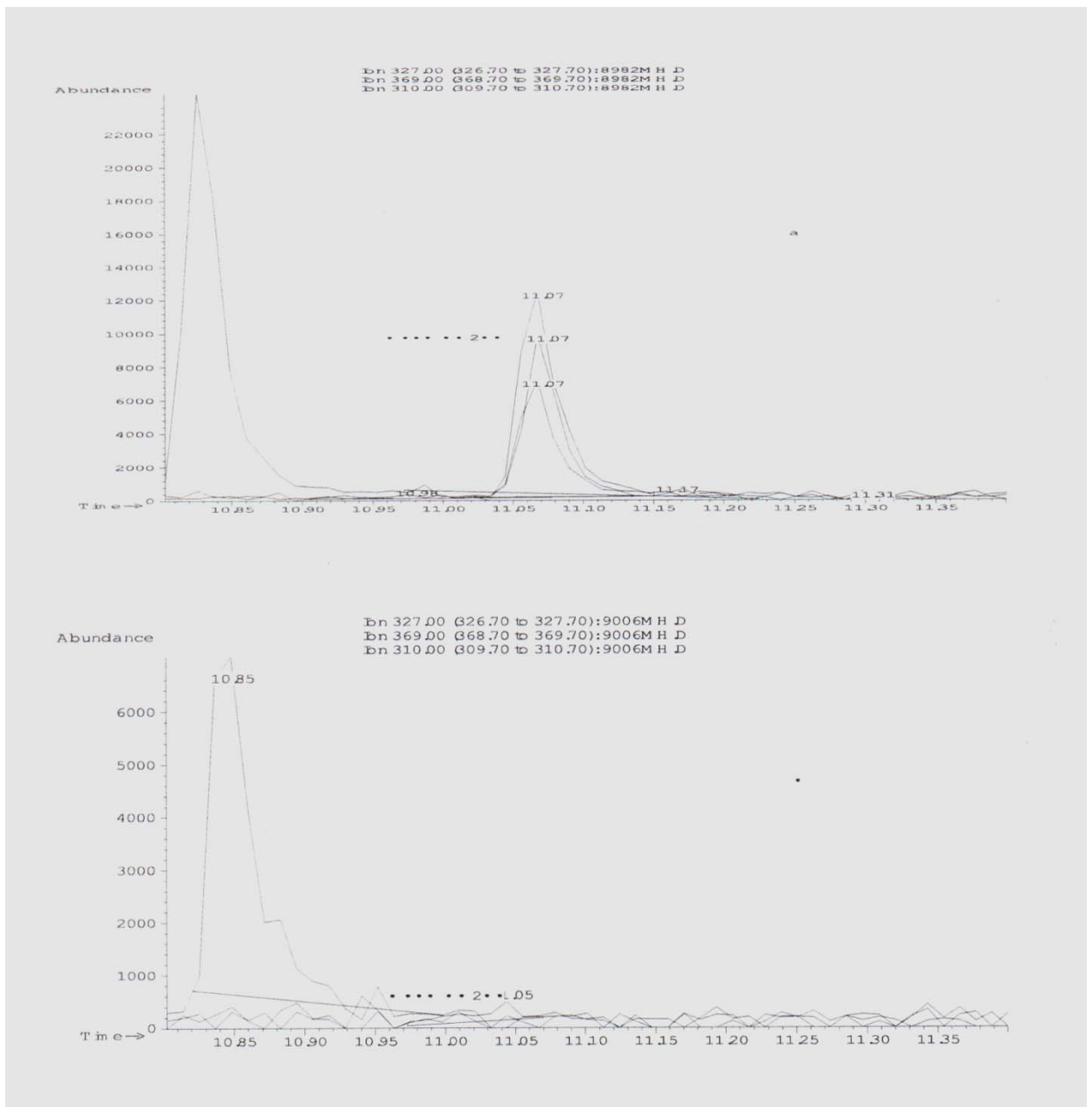


Рис.3.2 Хроматограми за характеристичним іоном при наявності морфіна-0,6 мкг/мл у пробі (а) і «холостої» проби (в)

Таким чином, складаючи нові макрокоманди і додаючи до них пошук нових наркотичних, лікарських речовин, їм метаболітів та дериватів, можливо істотно розширити коло пошуку. В теперішній час при екранізні сечі на наркотичні та лікарські речовини нами використовується 10 макрокоманд, до яких включені усі наркотичні та лікарські препарати, які лабораторія зобов'язана контролювати при «загальному аналізі», їх найбільш важливі метаболіти та деривати, а також деякі інші лікарські речовини, які, за нашим досвідом, мають токсикологічне значення і часто ідентифікуються

нами при аналізах. Всього за допомогою макрокоманд ми проводимо цілеспрямований пошук 120 речовин, їх вибір обмежений тільки доцільністю та фізичними можливостями оператора. При подальшому різкому збільшенні кількості досліджуваних оператором хроматограми збільшує ризик пропущення позитивного сигналу. Подальше розширення цілеспрямованого пошуку може бути пов'язаний з введенням методики пошуку за груповими іонами, однак, з-за згаданих раніше причин, поки що не готові повністю перейти на цю методику.

Післямова

Дане видання «Практичний посібник по скринінгу лікарських, наркотичних речовин та їх метаболітів методом газової хроматографії з мас-селективним детектором» розроблено і створене співробітниками кафедри токсикологічної та токсикологічної хімії Запорізького державного медичного університету та співробітниками Запорізького обласного бюро судово-медичної експертизи. «Практичний посібник по скринінгу лікарських, наркотичних речовин та їх метаболітів методом газової хроматографії з мас-селективним детектором»

призначений для співробітників кафедри токсикологічної та неорганічної хімії та студентів фармацевтичного факультету при вивченні токсикологічної хімії, а також при проведенні практичних занять.

Виданий посібник може бути використаний при проведенні хіміко-токсикологічних досліджень на наявність згаданих речовин у біологічних об'єктах та лікарських препаратах.

Список літературних джерел

1. O.H. Drummer, S. Horomidis, S. Kourtis, M.L. Syrjanen, P. Tippet, J. Anal. Toxicol., - 1994, - V.18, - p.134-138.
2. D.J. Ehresman, S.M. Prise, D.J. Lakutua, J. Anal. Toxicol., - 1985, - V.9, - p.55-62.
3. V.W. Watts, T.F. Simonick, J. Anal. Toxicol., - 1986, - V.10, - p.198-204.
4. H.H. Maurer, J. Chromatogr., B, - 1992, - V.580, - p.3-41.

5. R.A. Brainthnaite, D.R. Jarvie, P.S.B. Minty, D. Simpson, B. Widdop, *Ann. Clin. Biochem.*, - 1995, - V.32, - p.123-153.
6. D. Simpson, R.A. Brainthnaite, D.R. Jarvie, M.J. Stewart, S. Walker, I.W. Watson, B. Widdop, *Ann. Clin. Biochem.*, - 1997, V.34, - p.460-510.
7. H.H. Maurer. *MED. Focus.* – 1994, - V.12, - p.32-36.
8. M.R. Moeller, *J. Chromatogr., B*, - 1992, - V.580, - p.125-134.
9. O.H. Drummer, *J. Chromatogr., B*, - 1999, - V.733, - p.27-45.
10. R.A. de Zeeuw, *J. Chromatogr., B*, - 1989, - V. 488, - p.199.
11. H.H. Maurer, P. Wollenberg. *Drug Res.*, - 1990, - V.40, p.460.
12. A. Poletini, *J. Anal. Toxicol.*, - 1996, - *Anal. Toxicol.*, - V.20, p.579-586.
13. C. Drouet-Coassolo, C. Aubert, P. Coassolo, J.P. Cano, *J. Chromatogr., B*, - 1989, - V. 487, - p.295.
14. J.V. Smith, K. Wise, R.W. Johnson, *Appl. Note № 228-72*, Hewlett Packard, 1989.
15. A. Tracqui, P. Kintz, P. Mangin, *J. Forensic Sci.*, - 1995, - V.40, - p.254-262.
16. H.H. Maurer, T. Kraemer, O. Ledvinka, C.J. Schmitt, A. Weber, *J. Chromatogr., B*, - 1990, - V.530, - p.307-326.
17. D.S. Isenschmid, B.S. Levine, Y.H. Caplan. *J. Anal. Toxicol.*, - 1988, - V.12, - p.242.
18. C.R. Coodall, B.J. Basteyns. *J. Anal. Toxicol.*, - 1995, - V.19, - p.419-426.
19. H. Hattori, S. Ymamoto, M. Iwata, E. Takeshima, T. Yamada. *J. Chromat., B.*, - 1992, - V.579, - p.247-252.
20. K.J. Lee, G.S. Heo, N.J. Kim, D.C. Moon. *J. Chromatogr., B.*, - 1992, - V.608, - p.243-250.
21. R.N. Gupta. *J. Chromatogr., B.*, - 1992, - V.579, - p.183-211.
22. Н.В. Веселовская, А.Е. Коваленко. *Наркотики*. М.: Триада-Х, - 2000, - 206с.
23. Clarke`s isolation and identification of drugs. London, Pharmaceutical Press, - 1986, - 1173 p.

24. Химико-токсикологический анализ веществ, вызывающих одурманивание. Методические указания. Москва, - 1989, - 112с.
25. С.С. Барсегян, И.Б. Барсегян. В сб: Современные проблемы химико-токсикологического анализа наркотических средств (Материалы Всероссийской научно-практической конференции 23-24 сентября 1999г.). СПб.: НИИХ СПбГУ, - 1999, - с.35-37.
26. R. Brenneisen. Labolife, - 1997, - V.6, p.15-18.
27. Н.Н. Maurer, F.X. Tauvel, T. Kraemer. J. Anal. Toxicol., -2001, - V.25, - p.237-245.
28. D. Wilkins, H. Haughey, E. Cone, M. Huestis, R. Foltz, D. Rollins. J. Anal. Toxicol., - 1995, - V.19, - p.483-491.
29. K. Pfleger, H.N. Maurer, A. Weber. Mass Spectral Library of Drug, Poisons, Pollutants and their Metabolites, Hewlett – Packard, Palo Alto, CA, - 1999.
30. С.С. Катаев, И.Ю. Смирнова, В.А. Залесова, Л.Н. Курдина. СМЭ, - 2000, №1, - с.27-31.
31. С.С. Катаев, Л.Н. Курдина, В.А. Залесова, Л.В. Тереньева, В.П. Гагариню. СМЭ, - 2001, - №4, - с.34-37.
32. В.А. Goldberger, М.А. Huestis GC/MS: Quality control. Quality control procedures for forensic urine drug testing laboratories; Hewlett Packard, Technical note.

Додаток 1.

Хроматографічна база даних з індексами утримання на фазі НР-5

№ з.п.	Сполуки	Індекс RI(НР-5)	Індекс [29]RI (НР-1)	Час утримання	Характеристичні іони			Індекс RI (НР-5) [літра]
					m/z1	m/z2	m/z3	
1	Нафталін	1205	1190	3,62	128	102	127	

2	Резорцинол	1325		4,09	110	81	82	
3	Гліцерин 3 Ас	1335	1490	4,12	103	145	116	
4	Нікотин	1360	1380	4,22	84	133	162	
5	Ефедрин артефакт	1390*		4,34	71	56	105	
6	Ніацинамід	1435	1605	4,5	122	78	106	
7	Метилпарабен	1450	1510	4,55	121	152	93	
8	Кардіамін-М	1490		4,71	106	149	78	
9	4-аміно- ацетофенон	1505		4,75	120	135	92	
10	Барбітал	1515*	1500	4,8	156	141	155	
11	Ванілін АС	1520	1650	4,81	152	151	194	
12	Анабазин	1530		4,85	133	162	163	
13	МДМА	1550	1790	4,92	58	135	193	
14	Кардіамін(Никета мід)	1550*	1535	4,93	106	177	78	
15	Пропранолол-М (нафтол) Ас	1595	1555	5,1	144	115	186	
16	Амобарбітал-2Ме	1610	1595	5,16	169	184	225	
17	Ибупрофен	1620	1615	5,2	163	161	206	
18	Метилекгонін Ас	1625	1595	5,22	82	182	241	
19	Пентобарбітал- 2Ме	1640	1630	5,28	169	184	225	
20	Просидол-М(нор-)				116	102	58	1660[3 1]
21	Фенацетин	1705	1680	5,56	108	179	137	
22	Ізоніазид ТФА	1715		5,6	106	78	233	
23	Котонін	1720*	1715	5,61	98	176	175	
24	Парацетамол	1720	1780	5,61	109	151	80	

25	Метронідазол Ас	1720	1695	5,62	1680	1695	87	
26	Димедрол НУ Ас	1730	1700	5,65	165	167	226	
27	Глоперидол-М- 2Н ₂ О	1735	1650	5,67	189	191	154	
28	Амобарбітал (Барбаміл)	1740*	1710	5,7	156	141	197	
29	МДМА ТФА	1755		5,75	154	162	289	
30	Пентобарбітал (Етамінал)	1770	1740	5,83	156	141	197	
31	Піроксан артифакт	1775		5,85	163	190	135	
32	Промедол НУ-Ас	1785		5,89	186	201	261	
33	Парацетамол 2АС	1805		5,97	109	151	235	
34	Мепробамал	1815		6,03	83	55	144	
35	Парацетамол Ас	1825	1770	6,07	109	151	193	
36	Пентобарбітал-М (ОН)2Ме	1835	1820	6,13	169	184	223	
37	Гексабарбітал-Ме	1840	1085	6,16	235	169	250	
38	Промедол	1855*		6,27	186	201	275	
39	Кофеїн	1860*	1820	6,27	194	109	193	
40	Фенобарбітал- 2Ме	1870	1860	6,32	232	117	175	
41	Карбамазепін-М (акридин)	1880	1800	6,36	179	151	178	
42	Циклобарбітал- 2Ме	1885	1845	6,4	235	169	236	
43	Трамадол-Н ₂ О	1890	1905	6,42	58	155	245	
44	Мебікар	1895		6,45	112	198	126	
45	Димедрол	1895	1870	6,45	58	165	167	

46	Кетамін	1895*	1835	6,47	180	182	209	
47	Гексабарбітал	1900	1855	6,47	221	157	236	
48	Тіопентан	1900	1855	6,47	172	157	242	
49	Просидол-НУ- Н ₂ О				172	158	173	1911[3 1]
50	Лідокаїн	1920	1875	6,57	86	120	234	
51	Трамадол-М(N- дезметил-)-Н ₂ О Ас	1940		6,68	258	58	273	
52	Окспренолол	1940	1970	6,68	72	221	150	
53	Пентобарбітал- М2 2Ме	1945		6,7	169	184	225	
54	Доксиламін	1945	1920	6,7	58	71	180	
55	Дизопірамід артифакт	1950	1980	6,72	193	192	165	
56	Метронідазол- М(ОН-метил) 2Ас	1950	1870	6,72	87	229	271	
57	Клонидин 2Ме	1950		6,74	222	257	224	
58	Антипірин	1955	1845	6,76	188	96	105	
59	Бензокаїн Ас	1965	1990	6,81	120	165	207	
60	Амідопирин	1965	1895	6,81	56	231	97	
61	МДМА Ас	1990	2140	6,94	58	162	100	
62	Манноза 5Ас	1995	2000	6,97	115	157	331	
63	Имипрамін- М(цикл-)	2000	1930	6,98	195	194	180	
64	Трамадол	2000	1945	6,99	58	263	135	
65	Глюкоза 5Ас	2005	2010	7,01	115	157	242	
66	Клонидин-Ме	2005		7,01	208	243	210	
67	Просидол-НУ				190	172	191	2005[3

								1]
68	Трамадол-М(О- дезметил-)-Н ₂ О Ас	2010	2000	7,05	58	115	273	
69	Геофіллін	2015	2025	7,06	180	95	68	
70	Циклобарбітал	2020	1970	7,11	207	141	208	
71	Фенобарбітал	2020*	1965	7,22	204	117	232	
72	Клонідин-Pr	2025		7,13	229	231	236	
73	Метамізол (анальгін)	2055	1995	7,28	56	83	217	
74	Трамадол Ас	2060		7,32	58	188	305	
75	Карбамазепін- М/артифакт	2070	1990	7,37	193	192	165	
76	Прокаїн	2070	2025	7,37	86	99	120	
77	Клонідин-2 Pr	2070		7,39	194	236	278	
78	Циклізин	2070*	2045	7,4	194	165	265	
79	АХБ	2090*	2050	7,49	230	232	195	
80	Оксазепам артифакт 1	2100	2060	7,55	239	205	241	
81	Трамадол-М(О- дезметил-) Ас	2105	2080	7,57	58	205	291	
82	Атропін-Н ₂ О	2105*	2085	7,59	124	140	271	
83	Фенотіазин	2115		7,65	199	167	198	
84	МХБ	2140*	2100	7,8	245	228	247	
85	Клонідин(Клофе лін)	2155	2090	7,88	229	231	172	
86	Трамадол-М(О- дезметил-) 2Ас	2160		7,89	58	174	303	
87	Метопролол	2170	2120	7,95	264	279	278	

	артифакт							
88	Дибазол	2170		7,97	207	208	103	
89	Карбамазепін- М/артифакт Ас	2175	2040	7,98	193	235	165	
90	Метадон	2175	2160	7,99	72	165	294	
91	Диклофенак-Н ₂ О	2185	2135	8,04	214	242	277	
92	Просидол				172	246	173	2195[3 1]
93	Пропранолол	2205	2160	8,16	72	115	259	
94	Дизопирамід-М	2210		8,2	194	196	280	
95	Єтофілін-Ас	2220	2200	8,25	180	266	206	
96	Галопирамін (Супрастин)	2225	2190	8,28	58	125	127	
97	Кетамін-Ас	2225	2170	8,29	216	208	251	
98	Клонидин Ас	2230*	2060	8,29	236	238	271	
99	Диклофенак-Ме	2230	2195	8,3	214	242	309	
100	Адифенін	2240*	2215	8,38	86	165	167	
101	Амітриптилін	2245*	2205	8,44	58	202	215	
102	Атропін	2255	2215	8,47	124	289	140	
103	АХБ-Ви	2260			254	282	256	
104	Нортриптилін	2260	2255	8,51	202	189	220	
105	Пропранолол-М (дезамино-ОН-)2Ас	2265	2195	8,54	159	115	302	
106	Трамадол-М(ОН-) 2Ас	2270		8,57	58	174	363	
107	Амитриптилін-М (нор,ОН-)-Н ₂ О ТФА	2275		8,58	231	230	357	

108	АХБ-Ас	2275	2245	8,6	230	232	273	
109	Міансерин	2275	2210	8,6	193	264	220	
110	Іміпрамін(Імизин)	2275	2215	8,6	234	235	280	
111	АБХБ	2290		8,68	274	276	309	
112	МХБ Ас	2290	2260	8,7	244	228	246	
113	Триоксазин (Триметозин)	2295	2260	8,71	195	281	196	
114	Пентоксифілін- М(дигідро-)-Н ₂ О	2295	2300	8,71	181	180	262	
115	Медазепам	2300*	2235	8,72	242	207	270	
116	Гексамідин (Примідон)	2300	2260	8,74	190	146	117	
117	Амітриптилін-М (ОН)-Н ₂ О	2300	2235	8,75	58	215	275	
118	Пропранолол артифакт	2310	2210	8,81	127	115	271	
119	Тригексифенідил (Циклодол)	2310*	2250	8,85	98	218	219	
120	Морфін-2НФВ	2315*		8,9	464	677	465	
121	Метамизол-М Ас	2320	2270	8,86	56	245	203	
122	Маркаїн(Бупивак аїн)	2325	2260	8,88	140	141	84	
23	Прометазин (Дипразин)	2330	2270	8,92	72	180	284	
124	Клонидин-Вс	2350			194	230	284	
125	Атропін Ас	2360	2275	9,1	124	331	140	
126	Єтилморфін ТФА	2365	2320	9,12	296	409	380	
127	Доксиламін-	2370	2340	9,15	182	183	167	

	М(нор-) Ас							
128	Карбамазепін	2375	2285	9,18	236	193	192	
129	Метоклопрамід-ТФА	2380*		9,19	86	280	323	
130	Хлорпромазин-М (цикл-)	2395	2100	9,3	233	235	198	
131	Дифенін	2400	2350	9,33	180	252	223	
132	Кетамін-Вс	2400			180	244	236	
133	9-Тетрагідроканабінол Ме	2405	2360	9,35	313	328	285	2423[30]
134	Оксазепам	2405	2320	9,38	268	239	270	
135	Клонидин 2Ас	2415	2315	9,43	236	238	313	
136	Метамізол-М 2Ас	2420	2280	9,47	56	245	287	
137	Бутадіон	2420	2375	9,47	183	77	308	
138	Іміпрамін-М(ОН-цикл) Ас	2425	2535	9,48	211	253	210	
139	Прокаїн Ас	2425	2350	9,5	86	120	162	
140	Канабідіол	2425	2400	9,5	231	246	314	
141	Динезин	2435*		9,54	86	298	180	
142	Бромгексин	2435	2375	9,56	264	293	305	
143	Трамадол-М(N-дезметил,ОН)-Н ₂ О 2Ас	2440		9,58	116	331	228	
144	Фенобарбітал-М(ОН-)Ас	2445	2360	9,6	248	219	220	
145	Амітриптилін-М(нор-)ТФА	2445		9,62	232	217	359	
146	Кодеїн	2450*	2375	9,64	299	229	214	

147	Трамадол-М(О,N- дезметил-)-Н ₂ О 2Ас	2465		9,74	86	186	301	
148	Пентоксифілін- М(3-карбокси-) Ме	2470		9,75	180	207	394	
149	АБХБ-Ас	2470		9,76	274	311	353	
150	АНБ	2470	2365	9,77	241	77	242	
151	Канабінол Ме	2475		9,78	309	310	324	2490[3 0]
152	Карбамазепін-М (ОН -цикл) Ас	2485	2450	9,84	209	251	180	
153	Єтилморфін	2485	2420	9,85	313	284	243	
154	Диазепам	2500*	2430	9,91	283	256	285	
155	Трамадол-М(О,N- дезметил,ОН-) 2Ас	2500		9,95	114	319	276	
156	Морфін	2505	2455	9,98	285	215	268	
157	Пентоксифілін	2515	2435	10,03	221	193	180	
158	АНБ Ас	2515	2400	10,03	241	242	284	
159	Атропін-Ву	2515			124	359	140	
160	Пентоксифілін- М(дигидро)	2525	2505	10,1	180	193	280	
161	Тригексифенідил- М1	2525		10,1	98	281	346	
162	Верапаміл-М (дезалкіл) Ас	2530	2460	10,11	247	289	332	
163	9- Тетрагідроканабі	2530	2470	10,11	299	314	231	

	НОЛ							
164	Канабідіол-Ас	2540	2540	10,17	337	295	352	
165	Дизопірамід	2540	2490	10,18	195	212	239	
166	Хлорпромазин	2560*	2500	10,29	58	272	318,1	
167	Хлорпротиксен	2560	2510	10,29	58	221	255	
168	Тригексифенідин- М (ОН-)-Н ₂ О Ас	2565	2505	10,33	200	98	341	
169	Кодеїн-Ас	2580*	2500	10,35	341	282	342	
170	Левомепромазин	2580*	2540	10,40	58	328	228	
171	3-Моноацетилмор фін	2580	2500	10,41	327	285	215	
172	Тригексифеніділ- М2	2580		10,41	98	218	219	
173	Хлордіазепоксид -М(дезоксо)	2580	2535	10,42	282	283	284	
174	Нордазепам	2585	2520	10,43	242	269	271	
175	Пентоксифилін- М(дигидро-) Ас	2585	2560	10,45	180	181	322	
176	6- моноацетилморфі н	2590	2535	10,48	327	268	215	
177	Канабінол	2600	2555	10,52	295	238	296	
178	Єтилморфін Ас	2605*	2530	10,57	355	296	356	
179	Пропранолол 2Ас	2640	2605	10,76	200	115	201	
180	Тригексифенідил -М3	2645		10,79	98	218	219	
181	Прометазин- М(нор-) Ас	2660	2540	10,87	212	180	312	
182	Іміпрамін-М(ОН-	2665	2610	10,90	251	293	338	

) Ас							
183	Кодеїн Pro	2665*		10,85	355	282	229	
184	Хлороквин	2665*	2595	10,89	86	205	319	
185	Іміпрамін-М(ОН-)) Ас	2665	2610	10,90	251	293	338	
186	Міансерин- М(ОН-) Ас	2670	2580	10,92	209	322	278	
187	Триметоприм	2675	2590	10,95	290	259	275	
188	Алимемазин- М(ОН-) Ас	2674	2600	10,95	58	356	269	
189	Хлорпромазин-М (дезалил-,ОН-) 2Ас	2685		11	232	333	335	
190	Амітриптилін-М (ОН-) Ас	2690	2500	11,03	116	220	335	
191	Етилморфін-Pro	2700*		11,04	369	296	340	
192	Амітриптилін-М2 Ас	2690		11,05	116	217	333	
193	Героїн	2695*	2620	11,08	327	369	268	
194	Амітриптилін-М3 Ас	2710		11,16	217	215	319	
195	Тригексифенідил -М (ОН-) Ас	2715	2635	11,17	98	218	219	
196	Клозапін-ТФА	2725		11,25	352	323	365	
197	Хлорпромазин- М(ОН-)ізомер 2 Ас	2730		11,26	58	291	376	
198	Перметрин(цис-)	2745	2640	11,35	183	127	390	
199	Налоксон	2750	2715	11,39	327	328	242	

200	Трифтазин	2755	2690	11,4	407	306	280	
201	Кодеїн-Ву	2755			369	282	222	
202	Іміпрамін-М(нор-) Ас	2760	2670	11,45	208	193	308	
203	Перметрин(транс-))	2760	2670	11,45	183	127	390	
204	11-нор-9-ТГК 2Ме	2765	2620	11,45	313	357	372	2779[3 0]
205	Клозапін-М2 ТФА	2770		11,49	240	352	536	
206	Феназепам	2775*		11,52	350	321	348	
207	Ацетопромазин	2775	2755	11,53	58	280	326	
208	Пентоксифелін- М(дигідрокси-) ізомер2 2Ас	2775	2680	11,53	171	251	380	
209	Фентаніл	2780	2720	11,55	245	146	189	
210	Єтилморфін Ву	2785*		11,6	383	296	354	
211	Пентоксифелін-М (дигідрокси-) ізомер1 2Ас	2800		11,68	181	251	380	
212	Хінін Ас	2825		11,8	136	188	307	
213	Нітразепам	2840*	2760	11,86	280	253	264	
214	Триметопрім ізомер1 Ас	2845	2700	11,9	332	289	275	
215	Хлорпромазин-М (ОН-)ізомер4 Ас	2865		12	58	376	288	
216	Левомепромазин- М (ОН-) Ас	2865	2745	12	58	386	244	
217	Налоксон-2 Ас	2865	2750	12	369	411	352	

218	Клозапін-М(нор-) 2ТФА	2880		12,08	352	504	407	
219	Налоксон 3 Ас	2880	2770	12,09	411	453	394	
220	Хлорпромазин-М (ОН-)ізомер3 Ас	2880		12,1	58	376	288	
221	Хінін	2880		12,1	136	117	137	
222	Героїн-М(6- МAM) Вu	2885			327	397	268	
223	Морфін 2 Pro	2885*		12,09	341	397	324	
224	Тіаприд	2895	2820	12,16	86	213	256	
225	Папаверин	2900*	2820	12,23	338	324	308	
226	Пентоксифелін- М2 2Ас	2910		12,27	180	265	380	
227	р-йодоклонидин- PFB	2925			480	353	482	
228	Клозапін Ас	2945	2870	12,45	298	312	368	
229	Індометацин Ме	2935	2770	12,4	139	141	371	
230	Хлорпромазин-М (ОН-)ізомер1 Ас	2940		12,44	58	86	376	
231	Папаверин-М ізомер1 Ас	2945		12,46	310	324	367	
232	Клозапін	2970*	2895	12,63	243	256	258	
233	Сахароза 8Ас	2985	2950	12,7	115	157	242	
234	Клозапін-PrO	3010			312	325	382	
235	Папаверин-М ізомер4 Ас	3020		12,89	324	310	367	
236	Хлорпромазин-М (бис-нор-) Ас	3030	2990	12,96	100	332	232	
237	Клозапін Вu	3050			326	339	328	

238	Фенолфталеїн- 2Ме	3050		13,11	271	302	346	
239	Морфіна 2Вu	3055			355	268	425	
240	Хлорпромазин-М (нор-) Ас	3065	3070	13,2	114	232	346	
241	Триметоприм ізомер2 Ас	3070	2880	13,24	332	259	275	
242	Галоперидол	3080	2940	13,3	224	237	226	
243	Морфін-М(нор-) 3Ас	3080	2960	13,3	209	355	397	
244	Тофизопам (Грандаксин)	3100	3020	13,43	326	382	341	
245	Холестерин	3160*	3085	13,71	386	368	43	
246	Циннаризін	3160*	3040	13,86	201	117	251	
247	Іміпрамін- М(нор-, ОН-) 2Ас	3160	3070	13,88	114	266	366	
248	Токоферол Ас	3160	3070	13,9	430	472	165	
249	Триметоприм 2Ас	3180	3000	14,06	374	317	359	
250	Клозапін-М(ОН-) ізомер1 2Ас	3220	2980	14,36	256	314	426	
251	Тіоридазин	3225*	3125	14,37	98	370	244	
252	Верапаміл	3235	3150	14,51	303	304	151	
253	Холестерина ацетат	3245		14,62	368	369	353	
254	Стрихнін	3265*		14,7	334	335	162	
255	Хлорпромазин-М (2ОН-) 2Ас	3275		14,85	58	433	392	
256	Клозапін-М(ОН-) ізомер2 Ас	3315	3050	15,23	259	314	384	

257	Верошпирон	3345*		15,54	267	340	325	
258	Перициазин	3385*	3265	15,95	114	223	365	
259	Клозапін-М(ОН-) ізомер3 2Ac	3395		16,1	298	426	428	
260	Клозапін-М(нор-) 2Ac	3440	3490	16,64	396	310	298	
261	Хлорпромазин-М (нор-, ОН-) 2Ac	3465		17	114	404	248	
262	Клозапін-М(нор-) Ac	3490	3650	17,3	354	243	192	
263	Клозапін-М2	3505		17,49	298	242	396	
264	Холестерин-Вu	3510		17,6	368	353	369	
265	Бупренорфін Ac	3530*	3410	17,8	420	452	509	
266	Клозапін-М3	3540		17,97	374	269	376	
267	Бупренорфін PrO	3640*		19,33	434	466	523	

Примечание – Индекси утримання, які помічені* одержанні усередненням значень за двома хроматографічними режимами на фазі НР-5.

Додаток 2

!-----macro fale narc 1.mac-----

Макрокоманда для ілюстрації пошуку аналізованих сполук за хроматографами, що були реконструйовані

```
name acyll
file
tic, ro
format merged
initthresh 10
tlow=4.4.
```

thigh=5.2

chr tlow:thigh,86,118,177

integrate x,tlow: thigh

dr 5

IN 1

annotate 5,0,ii,t,"Амфетамін Ас"

exc x,r, 1

tlow=4.7

thigh=5.5

chr tlow:thigh,58,100,117

integrate x,tlow: thigh

dr 6

IN 1

annotate 6,0,ii,t,"Метамфетамін Ас"

exc x,r,2

tlow=5.8

thigh=6.4

chr tlow:thigh,58,100,148

integrate x,tlow: thigh

dr 7

IN 1

annotate 7,0,ii,t,"Ефедрин 2Ас"

exc x,r,3

tlow=4.9

thigh=5.5

chr tlow:thigh,58,182,241

integrate x,tlow: thigh

dr 8

IN 1

annotate 8,0,ii,t,"Метилекгонін Ас"

exc x,r,4

tlow=5.6

thigh=6.2

chr tlow:thigh,186,201,261

integrate x,tlow: thigh

dr 9

IN 1

annotate 9,0,ii,t,"Тримепиридин-НУАс"

exc x,r,5

tlow=6.6

thigh=7.3

chr tlow:thigh,58,162,100

integrate x,tlow: thigh

dr 10

IN 1

annotate 10,0,ii,t,"МДМА Ас"

exc x,r,6

tlow=7.0

thigh=7.6

chr tlow:thigh,58,188,305

integrate x,tlow: thigh

dr 11

IN 1

annotate 11,0,ii,t,"Трамадол Ас"

exc x,r,7

tlow=7.7

thigh=8.3

chr tlow:thigh,72,165,294

integrate x,tlow: thigh

dr 12

IN 1

annotate 12,0,ii,t,"Метадон Ас"

exc x,r,8

tlow=8.0

thigh=8.6

chr tlow:thigh,216,208,251

integrate x,tlow: thigh

dr 13

IN 1

annotate 13,0,ii,t,"Кетамін Ас"

exc x,r,9

tlow=10.0

thigh=10.7

chr tlow:thigh,341,282,342

integrate x,tlow: thigh

dr 14

IN 1

annotate 14,0,ii,t,"Кодеїн Ас"

tlow=10.2

thigh=10.9

chr tlow:thigh,355,296,356

integrate x,tlow: thigh

dr15

IN 1

annotate 15,0,ii,t,"Етилморфін Ас-ISTD"

tlow=10.8

thigh=11.4

chr tlow:thigh,327,369,310

integrate x,tlow: thigh

dr 16

IN 1

 annotate 16,0,ii,t,"Морфін 2Ac"

return

name IN 1 "Integretion"

getscalars, x [1]

=0.8*Yhigh

ii=(tlow+0.2)*60000

return