

PHARMACEUTICAL SCIENCES

DOI <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-113-8-29>

ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОМБИНИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ МЕТОДОМ ГХ-МС

Аносова Л. С.

*кандидат фармацевтической наук,
доцент кафедры фармацевтической и медицинской химии
Донецкий национальный медицинский университет*

Агафонов А. М.

*ассистент кафедры фармацевтической и медицинской химии
Донецкий национальный медицинский университет
г. Донецк, Украина*

В настоящее время число лиц употребляющих нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) в мире составляет несколько сотен миллионов человек, по частоте применения они занимают одно из первых мест. В практической медицине НПВС выпускаются в виде таблеток, мазей, суппозиториев, растворов для парентерального введения. Отпуск данной группы препаратов являются ОТС-препаратами. Большая популярность применения этих средств объясняется тем, что они обладают разным фармакологическим действием и широко используются в качестве средств, при болях разной этиологии. Особую озабоченность вызывает применение комбинированных препаратов, содержащие, кроме НПВС, психостимулирующие средства и спазмолитики – кофеин и дротаверин (спазмалгон эффект, пенталгин) [1].

Химико-токсикологический анализ включает в себя стадию обнаружения фактов приема препарата по методикам скрининга биологических сред организма и последующий подтверждающий анализ по частным методикам с количественным определением обнаруженных веществ.

Газовая хроматография является одним из экспрессных методов физико-химического анализа, который в судебно-химической практике используется для идентификации и количественного определения ксенобиотиков, ставших причиной летальных и острых отравлений,

характеризуется высокой чувствительностью и позволяет выявлять «следовые» количества веществ – до 10^{-8} % [2].

Поскольку лекарственные препараты подвергаются в организме человека интенсивной биотрансформации, для обнаружения фактов его потребления необходимы данные об основных метаболитах. Для подтверждения факта приема и определение степени воздействия препарата на организм, необходимо количественное определение всех составляющих комбинированного препарата в биожидкостях.

На фармацевтическом рынке широко представлены комбинированные лекарственные препараты, которые в одной лекарственной форме содержат парацетамол, напроксен, кофеин, дротаверина гидрохлорид, фенирамина малеат.

Целью работы явилась разработка метода изолирования и проведение идентификации в биологической жидкости (интактная моча человека) лекарственных субстанций комбинированного препарата методом газовой хроматографией с масс-селективным детектором (ГХ-МС).

В качестве *объектов исследования* были выбраны лекарственные субстанции, которые входят в комбинированный лекарственный препарат (спазмалгон эффект, пенталгин): парацетамол [N-(4-гидроксифенил)ацетамид], напроксен [(S)-6-Метокси-альфа-метил-2-нафталинуксусная кислота], кофеин [1,3,7-триметилксантин], дротаверин [1-[3,4-Диэтоксифенил) метилен]-6,7-диэтокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин], фенирамин малеата [N,N-Диметил-гамма-фенил-2-пиридинпропанамин] [3].

Газо-хроматографический анализ комбинированного препарата осложняется тем, что данные соединения имеют большую молекулярную массу. Как известно из литературных источников, преимущественно при ГХ-анализе соединения подвергают дериватизации, с целью устранения процессов разложения веществ при высоких температурах [4]. Поэтому, анализ проводился после предварительной дериватизации.

Для получения достоверных данных при применении метода ГХ / МС в судебно-химическом анализе исследуемые пробы должны быть очищены от посторонних примесей, которые могут влиять на достоверность результатов анализа [2].

Условия ГХ-МС-анализа: хроматограф Agilent 6890 N, мас-детектор Agilent 5975; колонка капиллярная Agilent HP 1– неподвижная фаза метилсилоксан (30 м×0,25 мм, 0,25 мкм); газ-носитель – гелий, скорость потока – 1,0 мл/мин; начальная температура колонки 70 °С-1,00 мин, следующее повышение со скоростью 15 ° С/мин до 295 °С/мин, изотермический режим (295 °С) – 4 мин; температура инжектора –

250 °С, температура источника излучения и квадруполь масс-детектора устанавливались на уровне 230 °С и 150 °С, соответственно, объем введенной пробы-1 мкл; масс-детекция проводится при электронной ионизации 70 eV, а сканирование проводилось в режиме SCAN, в диапазоне 45 – 550 атомных единиц массы (m/z).

Управление данным производилось согласно программного обеспечения Agilent ChemStation (версия E.01.01.335). Парацетамол, напроксен, кофеин, дротаверин, фенирамин в пробах идентифицировали по времени удерживания и масс-спектрам.

Методика изолирования из биожидкостей (интактная моча человека). В связи с образованием конъюгатов анализируемых веществ, при анализе мочи, стадии изолирования предшествует стадия *кислотного гидролиза* для их разрушения. К 3 мл мочи с исследуемыми веществами прибавляли 3 мл дихлорметана и кислоту хлористоводородную концентрированную для разрушения конъюгатов до pH =2-3 (по индикаторной бумаге), нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 мин. После кипячения добавляли дихлорметан и изменяли pH среды посредством добавления гидроксида аммония до pH =9 (по индикаторной бумаге). Охлаждали, осадок отделяли путём центрифугирования 3000 об/мин. в течение 10 мин и отбрасывали. Надосадочную жидкость переносили в выпарительную чашку и выпаривали до сухого остатка.

Щелочной гидролиз. К 3 мл мочи с исследуемыми веществами прибавляли 3 мл дихлорметана и гексана (8:1), добавляли 2 г карбонатного буфера до pH =9-10 (по индикаторной бумаге), нагревали на водяной бане в течение 20 мин при 70⁰С. После проводили высаливание. После этапа высаливания добавляли дихлорметан и изменяли pH среды посредством добавления хлористоводородной кислоты до pH =3 (по индикаторной бумаге). Охлаждали, осадок отделяли путём центрифугирования 3000 об/мин. в течение 10 мин и отбрасывали. Надосадочную жидкость переносили в выпарительную чашку и выпаривали до сухого остатка.

При определении щелочного извлечения методом ГХ-МС использовали метод *пробоподготовки* – силирование с BSTFA. К исследуемому объекту, помещенному в виалу, прибавляли 20 мкл 25%-ного раствора BSTFA и 25 мкл этилацетата. Смесь термосатитровали при 90 °С в течение 20 мин, затем упаривали до сухого остатка, после этого проводили исследование методом ГХ-МС.

Полученные масс-спектры сравнивали с библиотечными масс-спектрами (библиотеки NIST'2002, Wiley 7N, PMW-TOX 3, США).

После кислотного гидролиза с предварительной дериватизацией обнаружались исследуемые вещества кофеин – время удержания которого составляет $10,96 \pm 0,04$ мин. и фенирамин – время удержания $11,005 \pm 0,03$ мин. Также обнаружены метаболит парацетамола – п-Аминофенол (время удерживания $6,39 \pm 0,03$ мин), и метаболит фенирамина – норфенирамин (время удерживания $12,46 \pm 0,04$ мин).

Масс-спектр кофеина характеризуется сигналами при 194, 165, 109, 82, 67, 55 m/z. Масс-спектр фенирамина характеризуется сигналами при 240, 182, 169, 126, 103, 86, 72, 58 m/z. Масс-спектр метаболита фенирамина – норфенирамин характеризуется сигналами при 321, 253, 225, 182, 169, 140, 91, 69, 51 m/z. Масс-спектр метаболита парацетамола п-Аминофенол-2TFA – характеризуется сигналами при 301, 232, 204, 176, 109, 69 m/z.

После силирования и щелочного гидролиза обнаружены метаболиты парацетамола – парацетамол 2TMS (время удерживания $9,71 \pm 0,04$ мин) и парацетамол O– TMS (время удерживания $10,39 \pm 0,03$ мин), а также метаболиты напроксена – напроксен– TMS (время удерживания $12,73 \pm 0,02$ мин) и дезметилнапроксен –2 TMS (время удерживания $13,226 \pm 0,04$ мин).

Масс-спектр метаболита парацетамол-2TMS – характеризуется сигналами при 295, 280, 206, 116 m/z. Масс-спектр метаболита парацетамол-O-TMS – характеризуется сигналами при 223, 208, 181, 166, 106 m/z. Масс-спектр метаболита напроксен– TMS – характеризуется сигналами при 302, 287, 243 185, 141, 115, 73 m/z. Масс-спектр метаболита дезметилнапроксен –2 TMS – характеризуется сигналами при 360, 345, 243, 73 m/z.

Литература:

1. Химико-токсикологическое исследование некоторых нестероидных противовоспалительных средств. Ваталев А.А., Киреева А.В., Куклин В.Н. *Бутлеровские сообщения*. 2014. Т. 39. № 7. С. 108–116.
2. Хроматографические методы в аналитическом обеспечении создания и контроля качества лекарственных средств в Украине / под ред. Член-кор. НАН Украины В.П. Георгиевского – Харьков: изд. НТМТ, 2016. – 288 с
3. Европейская фармакопея, 9-е издание. Deutscher Apotheker Verlag, Штутгарт 2017, ISBN 978-3-7692-6641-2.
4. Nollet L. M., Lambropoulou D. A. Gas chromatography–mass spectrometry. Chromatographic analysis of the environment: mass spectrometry based approaches. Fourth edition. 2017. Chapter 1. P. 3–25.