

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ОПИОИДНЫХ И НЕОПИОИДНЫХ АНАЛЬГЕТИКОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

А. А. Ваталёв, А. В. Киреева*, Н. А. Анисимова, В. Н. Куклин

*Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия,
Бюро судебно-медицинской экспертизы Ленинградской области**

Изучены условия изолирования некоторых анальгетиков. Предложен растворитель для экстракции, определен pH раствора. Разработаны условия идентификации анальгетиков методами тонкослойной хроматографии, ультрафиолетовой (УФ) спектроскопии, хромато-масс-спектрометрии, денситометрии, газожидкостной хроматографии. Показана возможность использования УФ-спектроскопии, высокоэффективной хроматографии и денситометрии для количественного определения. Определена сохраняемость препаратов в биообъектах.

Ключевые слова: анальгетики, изолирование, разделение, определение.

DETERMINATION OF SOME OPIOID AND NON-OPIOID ANALGESIC DRUGS IN BIOLOGIC FLUIDS

A. A. Vatalev, A. V. Kireeva, N. A. Anisimova, V. N. Kuklin

We have studied the conditions for isolation of analgesic drugs. We proposed a solvent for extraction, determined pH of the solution. We established the conditions for identification of analgesic drugs by using TLC, UV spectroscopy, chromatomass spectrometry, densitometry, and gas chromatography. We have shown that UV spectroscopy, HPLC and densitometry may be used for quantitative analysis. We have determined the stability of drugs in biological objects.

Key words: analgesics, isolation, separation, identification.

Злоупотребление наркотическими веществами относится к разряду наиболее важных социальных проблем. Особую озабоченность вызывают лекарственные препараты, обладающие обезболивающим эффектом. Такие препараты используются в качестве средств при болях разной этиологии, а также в период наркотической абстиненции. К этим соединениям относятся диклофенак, кеторолак, ибупрофен, пропифеназон, кетопрофен и др. В связи с ростом числа лиц, злоупотребляющих наркотическими препаратами, постоянно ведутся поиски новых веществ, по анальгетической активности не уступающих, а по безопасности значительно превышающих препараты настоящего времени. Синтезируемые вещества, в том числе буторфанол, декстрометорфан, обладают мощным анальгезирующим эффектом, сопоставимым по действию с морфином, но с гораздо меньшим наркотическим потенциалом [1, 7]. Отравления вышеперечисленными препаратами в результате их немедицинского применения, включая и смертельные, имеют место в судебно-медицинской практике.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определение диклофенака, кеторолака, кетопрофена, ибупрофена, нимесулида, пропифеназона, буторфанола и декстрометорфана в биологических жидкостях с целью диагностирования отравления, в том числе и при их совместном присутствии с наркотическими веществами, что позволит осуществить оценку степени тяжести отравления и оказать своевременную медицинскую помощь.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Буторфанол и декстрометорфан являются наркотическими анальгетиками, относятся к группе агонистов-антагонистов опиоидных рецепторов. Диклофенак, кеторолак, кетопрофен, ибупрофен, нимесулид, пропифеназон являются нестероидными противовоспалительными средствами (НПВС).

Препарат «Буторфанола тартрат» выпускается в форме растворов для инъекций. Максимальная концентрация его в плазме крови достигается через 0,5—1 ч после внутримышечного введения, связывание с белками крови составляет 80 %.

Декстрометорфан входит в состав противокашлевых препаратов (сиропы и аэрозоли). Хорошо всасывается при пероральном приеме, связывается с белками на 80 %.

Препарат «Кеторолака трометамин» выпускают в форме таблеток и растворов для инъекций. При пероральном и парентеральном введении препарата он быстро и полностью всасывается в тонком кишечнике и подвергается глубокому метаболизму в почках.

Препарат «Диклофенак» выпускают в форме таблеток, растворов для инъекций, суппозиторий и мазей. В крови диклофенак циркулирует в связанном с белками виде (99,7 %).

Ибупрофен выпускают в форме таблеток, гелей, мазей и входит в состав комплексных препаратов. Связывается с белками на 90 %.

Нимесулид входит в состав гелей, суспензий и таблеток. Связывается с белками на 99 %. Выводится с мочой только в виде метаболитов.

Кетопрофен выпускают в форме капсул, таблеток, суппозиториев, гелей и растворов для инъекций. Связывается с белками на 99 %.

Пропифеназон входит в состав комплексного препарата «Каффетин». Связывается с белками на 80 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было изучено влияние природы растворителя и pH среды на эффективность экстракции исследуемых веществ из водных растворов [4]. В качестве экстрагентов использовались органические растворители и их смеси, наиболее часто применяемые в химико-токсикологическом анализе: хлороформ, диэтиловый эфир, гексан, этилацетат, хлороформ-изопропанол (9:1), хлороформ-гептан-изопропанол (50:33:17), гексан-хлористый метилен-изопропанол (65:35:2); pH среды при извлечении варьировалась в интервале 2,0—12,0. Наибольшая степень экстракции (80—90 %) была достигнута при использовании: для буторфанола — смеси

растворителей хлороформ-изопропанол (9:1), pH среды 12; декстрометорфана — хлороформ, pH среды 12; кеторолака и диклофенака — хлороформ, pH среды 2; пропифеназона — гексан, pH среды 2, 10; ибупрофена — гексан, pH среды 10; кетопрофена — хлороформ и нимесулида — этилацетат, pH среды 4. Полученные данные использовали для изолирования изучаемых веществ из лекарственных форм и биологических жидкостей.

Анализируемые вещества дают цветные и осадочные реакции с реактивами, используемыми в фармацевтическом анализе [3].

Метод хроматографирования в тонком слое сорбента (вариант скрининга) осуществлялся на пластинках «Сорбфил — ПТСХ-П-А-УФ» в разных системах растворителей [2, 4]. Хроматографическая подвижность диклофенака, кеторолака, кетопрофена, ибупрофена, нимесулида, пропифеназона, буторфанола и декстрометорфана определялась при их совместном присутствии так и в сравнении с другими опиодными и неопиодными анальгетиками (табл. 1).

Таблица 1

Значения Rf исследуемых веществ при хроматографировании в различных системах растворителей на пластинке «Сорбфил»

| Система | Препараты | | | | | | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Кеторолак | Диклофенак | Нимесулид | Ибупрофен | Декстрометорфан | Буторфанол | Морфин | Кодеин | Индометацин | Метамизол |
| Хлороформ-ацетон (9:1) | 0,16 ± 0,03 | 0,11 ± 0,03 | 0,80 ± 0,07 | 0,54 ± 0,10 | 0,16 ± 0,03 | 0,97 ± 0,17 | 0,37 ± 0,06 | 0,89 ± 0,15 | 0,43 ± 0,08 | 0,05 ± 0,01 |
| Этанол-аммония гидроксида раствор 25 % (100:1,5) | 0,65 ± 0,05 | 0,83 ± 0,07 | 0,82 ± 0,07 | 0,66 ± 0,10 | 0,36 ± 0,05 | 0,82 ± 0,07 | 0,32 ± 0,05 | 0,27 ± 0,04 | 0,62 ± 0,10 | 0,57 ± 0,06 |

Сравнительный анализ исследуемых веществ и других ненаркотических и наркотических анальгетиков проводился с использованием ультрафиолетовой спектрометрии. Спектры поглощения исследуемых веществ записаны на спектрофотометре «Spectord-M-40» в пределах длин волн 220—400 нм в растворе кислоты хлористоводородной 0,1М, в растворе натрия гидроксида 0,1М и в 95° этиловом спирте. Ультрафиолетовые (УФ) спектры буторфанола, диклофенака, морфина, декстрометорфана и кодеина имеют близкие значения максимумов поглощения, поэтому метод УФ спектрометрии не может быть применен для анализа этих соединений при совместном присутствии без предварительного их разделения. В то же время для других НПВС этот метод может быть использован (табл. 2).

Метод газовой хроматографии (ГХ) проведен для буторфанола и диклофенака на газовом хроматографе «Кристалл»-2000М, с электрон-захватным детектором (ЭЗД). Исследование буторфанола проводилось после дериватизации его пентафторпропионовым ангидридом, а диклофенака — в нативной форме. Установлено, что времена удерживания диклофенака и

пентафторпропионильного производного буторфанола отличаются от времен удерживания пентафторпропионильных производных морфина и 6-моноацетилморфина (табл. 3).

Таблица 2

Максимумы поглощения исследуемых веществ в различных растворителях, нм

| Вещество | λ _{max} (HCl 0,1 М) | λ _{max} (NaOH 0,1 М) | λ _{max} (C ₂ H ₅ OH 95°) |
|-----------------|------------------------------|-------------------------------|---|
| Буторфанол | 278 ± 2 | - | - |
| Декстрометорфан | 278 ± 2 | 248 ± 2 | 280 ± 2 |
| Диклофенак | 273 ± 2 | 273 ± 2 | 285 ± 2 |
| Кеторолак | 248, 317 ± 2 | 248, 323 ± 2 | 245, 317 ± 2 |
| Морфин | 285 ± 2 | 298 ± 2 | 282 ± 2 |
| Кодеин | 285 ± 2 | - | - |
| Индометацин | 273, 318 ± 2 | 281 ± 2 | 268, 319 ± 2 |
| Анальгин | 239, 258 ± 2 | 275 ± 2 | 275 ± 2 |
| Пропифеназон | 285 ± 2 | - | 240 ± 2 |
| Нимесулид | - | 396 ± 2 | 305 ± 2 |
| Ибупрофен | - | 262 ± 2 | 362 ± 2 |
| Кетопрофен | 260 ± 2 | 262 ± 2 | 256 ± 2 |

Таблица 3

Результаты ГХ/ЭЗД исследования

| Соединение | Время удерживания (мин:с) |
|--|---------------------------|
| Буторфанола пентафторпропионильное производное | 13:44 |
| Диклофенак | 10:30 |
| Морфин дипентафторпропионильное производное | 11:02 |
| 6-Моноацетилморфина пентафторпропионильное производное | 12:27 |

Для идентификации диклофенака, кеторолака, кетопрофена, ибупрофена, нимесулида, пропифеназона, декстрометорфана и бутарфанола, а также продуктов реакции его с дериватирующими агентами (триметилсилильные и пентафторпропионильные производные) нами использовался также метод газовой хроматографии-масс-спектрометрии [5, 6, 8]. Анализ проводился на квадрупольном хроматомасс-спектрометрическом комплексе Agilent Technologies. Установлено, что полученные масс-спектры совпадают с литературными данными (табл. 4).

Таблица 4

Характерные ионы в масс-спектрах исследуемых веществ

| Соединение | Mr | Ионы |
|-----------------|-----|--|
| Буторфанол | 327 | 272, 273, 327, 254, 41, 157, 136, 227 |
| Буторфанол-2ТМС | 471 | 416, 326, 471, 200, 270, 456, 229, 381 |
| Буторфанол-ТМС | 399 | 344, 73, 345, 399, 326, 299, 271 |
| Буторфанол-ПФП | 489 | 418, 419, 119, 271, 207, 306, 473 |
| Декстрометорфан | 271 | 59, 271, 150, 270, 31, 214, 42, 171 |
| Диклофенак | 296 | 78, 89, 107, 151, 179, 214, 242, 277 |
| Кеторолак | 255 | 211, 77, 106, 134, 182, 196 |
| Пропифеназон | 230 | 215, 230, 56, 216, 96, 41, 39 |
| Кетопрофен | 254 | 105, 77, 177, 209, 254, 210, 103, 181 |
| Ибупрофен | 206 | 162, 163, 01, 119, 107, 206, 145 |
| Нимесулид | 308 | 154, 229, 308, 77, 51, 183, 199 |

Примечание. Ионы приведены в порядке убывания интенсивности.

В масс-спектрах буторфанола, декстрометорфана, диклофенака, пропифеназона, кетопрофена, ибупрофена, нимесулида с разной интенсивностью присутствуют пик молекулярного иона и другие характерные ионы. В масс-спектрах кеторолака отсутству-

ют пики молекулярного иона, но наблюдаются характеристичный ион m/z 211, образующийся в результате выброса из молекулярного иона молекулы CO_2 .

Разработаны условия определения изученных веществ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Анализ проводился на высокоэффективном жидкостном хроматографическом комплексе HP-1100 с диодно-матричным детектором, оснащенный микроколоной Hypersyl ODS C18. Наилучшие результаты определения и разделения исследуемых веществ (табл. 5) показало применение градиентного режима анализа с использованием в качестве компонентов подвижной фазы ацетонитрила и фосфатного буфера (рН 3,8). В качестве внутреннего стандарта использовали 5-(4-метилфенил)-5-фенилгидантоин (МРРН).

Таблица 5

Времена удерживания исследуемых веществ (метод ВЭЖХ, концентрация исследуемых соединений — 10 мкг/мл)

| № | Вещество | t_R , мин |
|----|----------------------------|-------------|
| 1 | Буторфанол | 7,85 |
| 2 | Декстрометорфан | 5,22 |
| 3 | Кеторолак | 11,39 |
| 4 | Диклофенак | 21,90 |
| 5 | Морфин | 1,67 |
| 6 | Кодеин | 2,83 |
| 7 | Амфетамин | 3,73 |
| 8 | Кетопрофен | 18,51 |
| 9 | Пропифеназон | 13,56 |
| 10 | Ибупрофен | 22,46 |
| 11 | Нимесулид | 12,63 |
| 12 | МРРН (внутренний стандарт) | 14,74 |

Разработанный нами метод ВЭЖХ с использованием внутреннего стандарта позволил определить микроколичества лекарственных веществ в извлечениях из биологических жидкостей и одновременно разделить, идентифицировать и произвести количественное определение искомых веществ. Определение проводилось при длине волны с максимумом абсорбции для каждого препарата в диапазоне концентраций 1—50 мкг/мл по предварительно построенным калибровочным графикам. Использование вышеуказанного метода позволяет определять изучаемые вещества в присутствии порядка 200 других лекарственных веществ.

Для количественного определения изучаемых веществ нами использовался и метод ультрафиолетовой спектрофотометрии. Для диклофенака, кеторолака, кетопрофена, пропифеназона, декстрометорфана и бутарфанола анализ проводился в растворе кислоты хлористоводородной 0,1М, а для ибупрофена, нимесулида — в растворе натрия гидроксида 0,1М при максимумах поглощения исследуемых веществ. Параллельно на пластинках «Сорбфил» для них был разработан хроматодезитометрический метод количественного определения. При сравнении методов установлено, что полученные результаты близки и воспроизводимы.

Разработанные методики анализа были апробированы на биологических жидкостях экспериментальных животных — белых беспородных крысах массой тела 180—220 г. Препараты «Туссин-Плюс» (декстрометорфан), «Кетопрофен», «Ибупрофен», «Найз» (нимесулид) и «Каффетин» (пропифеназон) вводились в желудок через зонд по 20—100 мг в виде взвеси с 10 мл воды очищенной, буторфанол, диклофенак и кеторолак вводились внутривенно однократно по 8 мг/кг в виде водного раствора с последующей водной нагрузкой. Забор крови производили через 1 ч, мочу собирали в течение 24 ч. Изолирование из крови и мочи проводили в условиях, указанных выше. Для осаждения белков использовали натрия хлорид. При исследовании препаратов в биологических жидкостях методами тонкослойной, газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии, УФ-спектроскопии, хромато-масс-спектрометрии было установлено, что полученные данные для исследуемых веществ, выделенных из крови и мочи, были идентичны соответствующим параметрам соединений, выделенных из лекарственных форм. Количественное определение буторфанола, декстрометорфана, кеторолака, диклофенака, кетопрофена, пропифеназона, ибупрофена и нимесулида, выделенных из биологических жидкостей экспериментальных животных, проводилось методами предложенными выше.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные при исследовании результаты позволяют установить факт использования диклофенака, кеторолака, кетопрофена, ибупрофена, нимесулида, пропифеназона, декстрометорфана и буторфанола в неме-

дицинских целях для купирования наркотической абстиненции и могут быть использованы в практике судебно-химических отделений Бюро судебно-медицинской экспертизы и химико-токсикологических лабораторий наркологических диспансеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабаян Э. А.* Правовые аспекты оборота наркотических, психотропных, сильнодействующих, ядовитых веществ и их прекурсоров. Государственные и ведомственные акты. — М.: МЦЭФР, 2002. — 320 с.
2. *Гейсс Ф.* Основы тонкослойной хроматографии. — М., 1999. — Т. 1 — 406 с.
3. Государственная Фармакопея Российской Федерации. Ч. 1. — М.: Изд. «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. — 704 с.: ил.
4. *Дегтярев Е. В.* // Хим.-фарм. журнал. — 1998. — Т. 32, № 5. — С. 48—54.
5. *Мелентьев А. Б.* // Проблемы экспертизы в медицине. — 2002. — № 4. — С. 15—21.
6. *Савчук С. А.* // Хим.-фарм. журнал. — 1999. — Т. 33, № 12. — С. 29—52.
7. *Элленхорн М. Дж.* Медицинская токсикология. Диагностика и лечение отравлений у человека. — М.: Медицина, 2003. — Т. 1. — С. 99—210.
8. *Clarke's analysis of Drugs and Poisons* / Ed. by A. C. Moffat, M. D. Osselton and Widdop, London.: Pharmaceutical Press, 2006. — 1632 p.

Контактная информация

Ваталёв Андрей Александрович — аспирант кафедры фармацевтической химии СПХФА, e-mail: Vatalev_Andrew@mail.ru