

УДК 543.544

DOI: 10.15372/KhUR20160115

## Исследование условий для извлечения лекарственных препаратов из волос и их анализа методом хромато-масс-спектрометрии

Я. Ю. КИСЛЯКОВА, Т. Ф. ШЕШКО, Ю. М. СЕРОВ

*Российский университет дружбы народов,  
ул. Миклухо-Маклая, 8, корп. 1, Москва 119571 (Россия)**E-mail: rupf@mail.ru*

(Поступила 17.03.15; после доработки 17.08.15)

### Аннотация

На примере лекарственных препаратов класса антидепрессантов (амитриптилин, карбамазепин) проведена экспериментальная оценка зависимости степени извлечения аналитов от параметров щелочной деструкции (концентрация гидроксида калия, температура гидролиза, время экспозиции) и применяемого органического растворителя для экстракции целевых веществ из гидролизата волос. По результатам исследований предложен универсальный способ пробоподготовки волос в рамках химико-токсикологического анализа: гидролиз образца в растворе 1.5 М КОН при 60 °С в течение 1.5 ч, последующая экстракция смесью гексан/этилацетат в объемном соотношении 5 : 1. Оптимизированы параметры хромато-масс-спектрометрического детектирования целевых веществ. Разработана методика анализа амитриптилина и карбамазепина в волосах методом ГХ-МС. Проведена процедура ее валидации, определен рабочий диапазон методики, который составил 1–100 нг/мг, а также пределы детектирования по амитриптилину и карбамазепину – 0.5 и 1 нг/мг соответственно. Данная методика успешно апробирована на реальных образцах волос.

**Ключевые слова:** анализ волос, ГХ-МС, амитриптилин, карбамазепин, щелочной гидролиз

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время волосы признаны третьим по популярности биологическим материалом исследования для установления факта попадания в организм лекарственных препаратов. Это связано с тем, что волосы не требуют каких-либо особых условий хранения, вещества в них сохраняются достаточно долго и содержатся, как правило, в нативном виде (т. е. исключается поиск сложных метаболитов) [1]. Анализ волос актуален не только в области судебной медицины, но и в других областях, таких как клиническая фармакология, клиническая токсикология и химия окружающей среды.

Волос состоит из внешней оболочки (кутикулы), внутренней сердцевины (медуллы) и стержня из коркового вещества. С химической точки зрения волосы человека преимущественно состоят из альфа-кератина. Полипептидная цепь этого белка построена в основном из глицина, лейцина, цистеина и пяти других аминокислот. Первичной структурой цепи здесь является правая  $\alpha$ -спираль, из которых образуется стержень волоса.

Известны три основные гипотезы проникновения веществ в волосы:

– активная или пассивная диффузия веществ из кровотока, питающего сосочки дермы, на стадии анагена;

– диффузия веществ из пота и сальных желез или на этапе выхода волоса на поверхность кожи;

– адсорбция веществ из окружающей среды (пыль, пары и т. д.).

Основными веществами, отвечающими за контакт экзогенных соединений с волосами, являются меланины.

Химико-токсикологический анализ волос включает исследование внешней поверхности (произведение внешнего смыва) и анализ внутренней области (непосредственная экстракция веществ из внутренней области волос). Внешний смыв с волос проводится при необходимости выявить контакт с целевыми экзогенными веществами, например, при судебном производстве для доказательства контакта с наркотическими средствами и психотропными веществами. Исследование внутренней области волос позволяет сделать вывод непосредственно об употреблении того или иного вещества.

Для извлечения веществ из внутренней области волос применяется либо механическое измельчение (ножницами или с помощью шаровой мельницы) с длительной выдержкой в растворителе, либо щелочной гидролиз. Механическое измельчение сопряжено с частичной потерей массы образца, а степень деградации не постоянна. Применение щелочного гидролиза позволяет полностью перевести твердые образцы волос в раствор, без потери массы образца.

В качестве анализируемых веществ нами выбраны лекарственные препараты класса антидепрессантов – амитриптилин и карбамазепин. За последние годы на территории Российской Федерации возросло количество людей, употребляющих данные препараты. Нередко их даже прописывают детям 7–12 лет, страдающим ночным энурезом. Однако вследствие доступности этих лекарственных средств и их способности потенцировать действие многих лекарств наблюдаются случаи отравления, вплоть до смертельных исходов. Таким образом, разработка экспрессного анализа амитриптилина и карбамазепина в волосах – одна из важных задач судебной химии и химико-токсикологического анализа.

Согласно данным [1], наиболее быстрый и эффективный способ извлечения веществ из матрицы волос – щелочной гидролиз. Однако

условия его проведения различаются, поэтому целесообразно оптимизировать процесс подготовки проб к анализу таким образом, чтобы обеспечить максимальную степень извлечения целевых веществ.

В работах [2, 4–6] описаны эксперименты по идентификации различных лекарственных препаратов (в том числе амитриптилина и карбамазепина) в волосах методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием (далее ГХ-МС) в ходе проведения общего скринингового анализа волос, а также приведены условия извлечения и идентификации целевых аналитов. Однако единого методологического подхода к анализу волос нет. Отсюда возникает необходимость создания унифицированной методики идентификации амитриптилина и карбамазепина в волосах.

Скрининговый анализ волос 35 пациентов психиатрического отделения [4] показал, что содержание амитриптилина в волосах варьируется в диапазоне 2.5–57 нг/мг, а карбамазепина – в пределах 2.8–22.5 нг/мг.

Цель данной работы – разработка наиболее быстрого и эффективного метода выделения лекарственных препаратов класса антидепрессантов (амитриптилина и карбамазепина) из матрицы волос; оптимизация условий их идентификации в матрице данного биообъекта методом ГХ-МС и разработка методики химико-токсикологического анализа амитриптилина и карбамазепина во внутренней области волос с пределом детектирования по целевым аналитам не выше 2 нг/мг.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования представляли собой модельные пробы волос с известным содержанием амитриптилина и карбамазепина, приготовленные специальным образом. Волосы людей, не употреблявших эти лекарственные препараты, отмывались от внешних загрязнителей и помещались в чистые полимерные пробирки в количестве  $(100 \pm 2)$  мг. Затем к каждому образцу волос добавляли по 10 мкл метанольных растворов аналитических стандартов амитриптилина и карбамазепина с концентрацией 100 мкг/мл каждого и оставляли пробирки открытыми до полного испарения

растворителя. Растворы стандартов готовили из фармацевтических препаратов “Амитриптилин” (содержание действующего вещества 10 мг/таб.) и “Карбамазепин” (200 мг/таб.), путем растворения таблеток в метаноле в ультразвуковой бане и последующего разведения полученных растворов до нужной концентрации.

Инструментальный анализ проводили методом ГХ-МС на оборудовании фирмы Agilent Technologies (США), состоящем из газового хроматографа 5890 и одноквадрупольного масс-спектрометра 5975С. Хроматограф оснащен капиллярной колонкой DB-5MS длиной 30 м, толщиной 0.25 мм, внутренний диаметр сорбента 0.25 мкм. Выбор хроматографической колонки основан на изучении литературных данных по газохроматографическому анализу волос на наличие веществ различной природы [3, 7–10].

Пробу объемом 1 мкл вводили с помощью автосамплера в режиме деления потока в соотношении 10 : 1. Температура инжектора и интерфейса составляла 270 °С, скорость потока газа-носителя (гелий) – 1.26 мл/мин.

Масс-спектрометр работал в режиме ионизации электронным ударом. Детектирование проводили в режиме полного сканирования ионов (Fullscan) в диапазоне 43–600 а. е. м. Энергия ионизации 70 эВ, задержка на растворитель 4 мин, общее время анализа первой пробы 30 мин.

В ходе оптимизации условий подготовки волос к инструментальному анализу варьировали следующие параметры:

- концентрация гидроксида калия (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 и 5.0 моль/л);
- температура гидролиза (40, 50, 60, 70 и 80 °С);
- время экспозиции (0.5, 1, 1.5, 2 и 3 ч);
- органический растворитель для проведения жидкость–жидкостной экстракции аналитов из гидролизата (метилтретбутиловый эфир, хлороформ, диэтиловый эфир, гексан/этилацетат в объемных соотношениях 2 : 1 и 5 : 1).

Для оценки каждого из варьируемых параметров приготовлено и проанализировано по три модельных образца волос массой (100±5) мг.

Пробы волос к анализу готовили по следующей схеме. К заранее приготовленным модельным образцам волос добавляли 10 мкл раствора внутреннего стандарта дифенил-

амина (далее ДФА) с концентрацией 100 мкг/мл, приливали по 2 мл щелочи соответствующей концентрации и выдерживали в сушильном шкафу, изменяя температурный и временной параметр. Далее пробы охлаждали до комнатной температуры и экстрагировали 3 мл растворителя на орбитальном миксере в течение 20 мин. Затем пробы центрифугировали на протяжении 2 мин при частоте 10 000 мин<sup>-1</sup>, органические (верхние) слои отбирали в чистые полимерные пробирки и упаривали досуха в токе азота при температуре 40 °С. К сухим остаткам проб добавляли по 100 мкл метанола и анализировали каждую пробу трижды методом ГХ-МС.

По результатам анализа инструментальных данных произведен расчет степеней извлечения  $\alpha$  целевых аналитов из матрицы волос по формуле:

$$\alpha = \frac{A_c^0 - A_{i/std}^0}{A_c - A_{i/std}} \cdot 100\% \quad (1)$$

где  $A_c^0$  – площадь пика анализируемого вещества в модельной пробе волос;  $A_{i/std}^0$  – площадь пика внутреннего стандарта в модельной пробе волос;  $A_c$  – площадь пика анализируемого вещества в том же количестве, в котором его добавляли к волосам;  $A_{i/std}$  – площадь пика внутреннего стандарта в том же количестве, в котором его добавляли к волосам.

Валидацию разработанной нами методики проводили в три этапа:

1. Определяли предел детектирования (ПД) и предел количественной оценки (ПКО).
2. Определяли линейный участок калибровочной кривой.
3. Определяли повторяемость с учетом погрешности прибора и пробоподготовки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Газовая хроматография с масс-селективным детектированием – наиболее распространенный метод, применяемый в области судебной медицины и химико-токсикологического анализа. К ее преимуществам можно отнести простоту обслуживания оборудования, а также наличие коммерческих библиотек масс-спектров различных соединений, облегчающих их идентификацию.

Первоначальной задачей нашей работы была оптимизация условий инструменталь-

ТАБЛИЦА 1

Условия работы термостата хроматографа

Этапы	Скорость нагрева, °С/мин	Конечная температура, °С	Время выдержки, мин
Начальный	–	60	0.5
Первый	15	180	4.0
Второй	10	260	0.5
Конечный	25	320	6.0

ного анализа ГХ-МС. На основе ряда экспериментальных данных определен температурный режим работы хроматографа (табл. 1). Первое плато предназначено для обеспечения адсорбционного взаимодействия веществ с фазой колонки. На втором плато с хроматографической колонки смывается большая часть органических соединений, присущих матрице волос. Температуры выхода с колонки амитриптилина и карбамазепина составляют примерно 260 °С, поэтому при этой температуре введено плато продолжительностью 0.5 мин. Последнее плато (320 °С, 6 мин) используется для удаления с хроматографической колонки труднолетучих компонентов матрицы волос.

Следует отметить, что использование данного температурного градиента не только обеспечивает хорошее разделение целевых аналитов, но и не требует дополнительной очистки колонки после проведения анализа.

Таким образом, разработанный нами метод хроматографического разделения исследуемых веществ пригоден для поточного анализа большого количества проб волос.

Идентификацию целевых аналитов на хроматограммах проб волос проводили с привлечением коммерческой библиотеки масс-спектров NIST 08, по которой определяли основные характеристические ионы соединений ( $m/z$  58 для амитриптилина,  $m/z$  193 для карбамазепина и  $m/z$  169 для ДФА) и далее путем выделения по ним хроматограмм определяли их времена удерживания и индексы Ковача. Для проведения количественных оценок использовали площади пиков целевых соединений на хроматограммах, построенных по выделенным ионам.

На рис. 1, а показаны зависимости степени извлечения амитриптилина и карбамазепина из матрицы волос от концентрации щелочи. Установлено, что во всем исследуемом

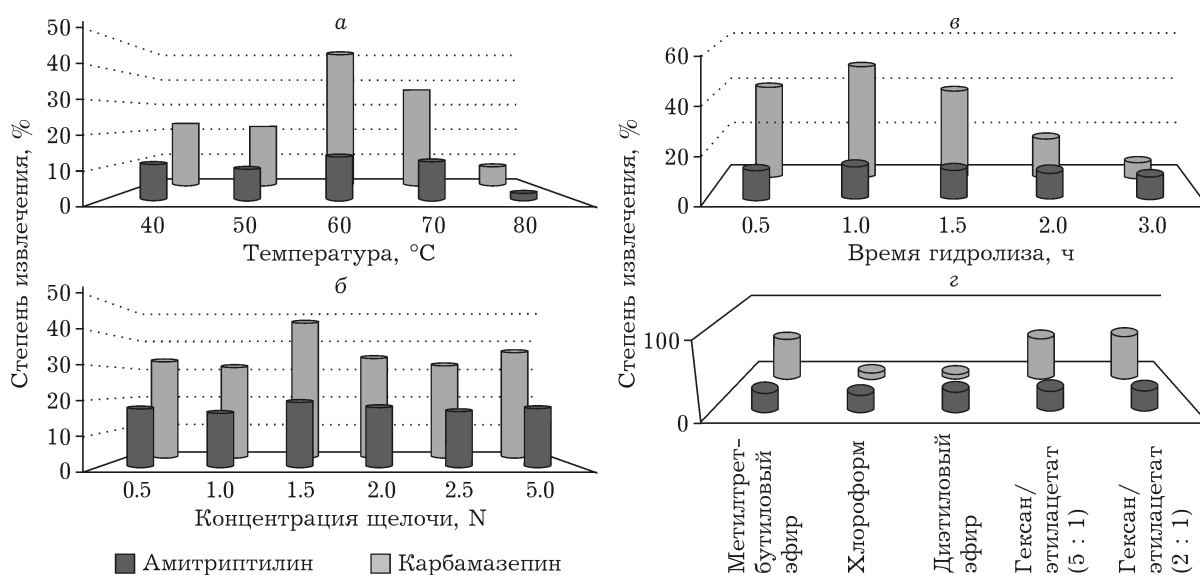


Рис. 1. Диаграммы зависимости степени извлечения амитриптилина и карбамазепина из матрицы волос от концентрации щелочи (а), времени гидролиза (б), температуры (в) и типа экстрагента (г).

диапазоне степень извлечения амитриптилина  $\alpha_{ам}$  изменяется незначительно. Однако в случае карбамазепина ( $\alpha_{карб}$ ) наблюдается небольшой максимум при концентрации КОН, равной 1.5 моль/л.

Оценка зависимостей степени извлечения аналитов от температуры и времени щелочного гидролиза, используемого для деструкции структуры волос, показала, что для обоих веществ оптимальное время составляет 1 ч (см. рис. 1, б), а температура – 60 °С (см. рис. 1, в). Однако в случае “жестких” образцов волос для полного растворения их структуры 1 ч недостаточно, поэтому выбрана экспозиция продолжительностью 1.5 ч.

В качестве универсального условия щелочного гидролиза волос выбрана экспозиция образцов волос в растворе 1.5 М КОН при 60 °С в течение 1.5 ч.

При выборе органического растворителя максимальные степени извлечения амитриптилина и карбамазепина достигались при использовании метилтретбутилового эфира ( $\alpha_{ам} = 23.4 \%$ ,  $\alpha_{карб} = 56 \%$ ) и смесей гексан/этилацетат в объемных соотношениях 2 : 1 ( $\alpha_{ам} = 25.7 \%$ ,  $\alpha_{карб} = 57.9 \%$ ) и 5 : 1 ( $\alpha_{ам} = 26.2 \%$ ,  $\alpha_{карб} = 61.4 \%$ ).

Сравнительный анализ хроматограмм показал (рис. 2), что при использовании метилтретбутилового эфира уровень химического шума значительно выше, чем при использовании смесей гексан/этилацетат в объемных соотношениях 2 : 1 и 5 : 1. Исходя из максимальных значений  $\alpha$  в качестве наиболее эффективного экстрагента выбрана смесь гексан/этилацетат в объемном соотношении 5 : 1.

По результатам оценки степеней извлечения целевых аналитов для разных параметров пробоподготовки волос предложена методика анализа амитриптилина и карбамазепина в волосах, обобщенная схема которой представлена на рис. 3.

Для определения величины ПД методики готовили пакет проб, который состоял из пяти отмытых от посторонних внешних загрязнителей образцов волос людей, не употреблявших анализируемые вещества (далее – бланковые пробы). Каждую из бланковых проб разделяли на три части (соответствующие трем содержаниям анализируемых веществ) массой по (100±5 мг) каждая. Путем добавления к ним стандартных растворов аналитов в разных количествах готовили контрольные пробы волос с различным содержанием целевых аналитов (табл. 2).

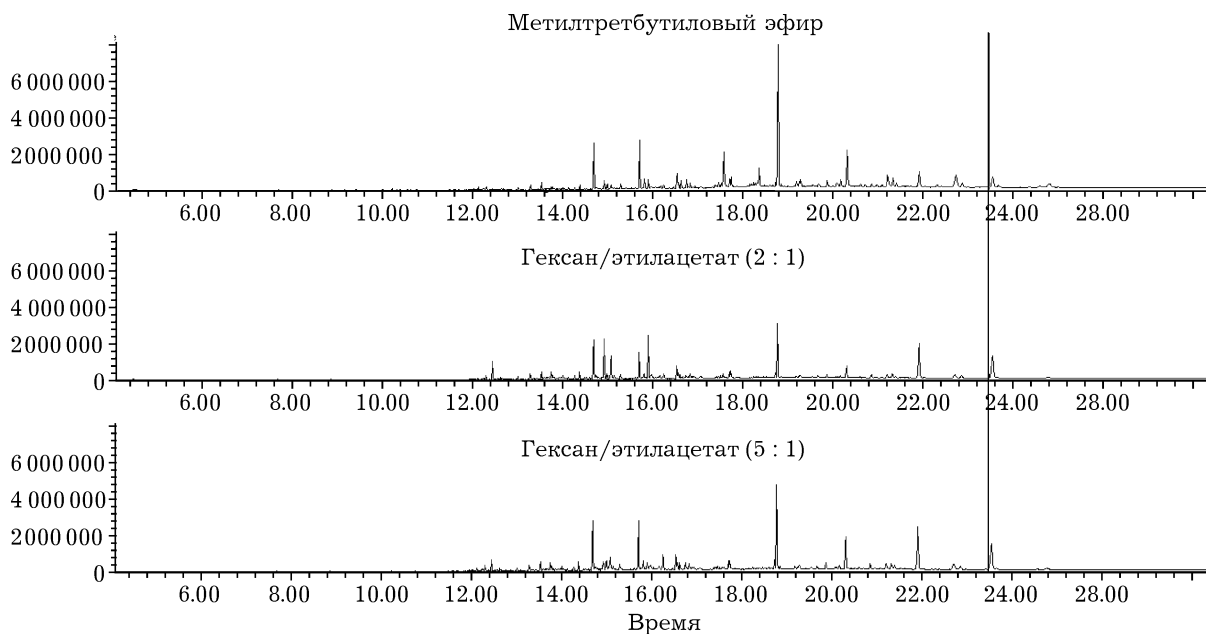


Рис. 2. Хроматограммы модельной пробы волос, построенные по ионам  $m/z$  58 (а), 193 (б) и 169 (в).

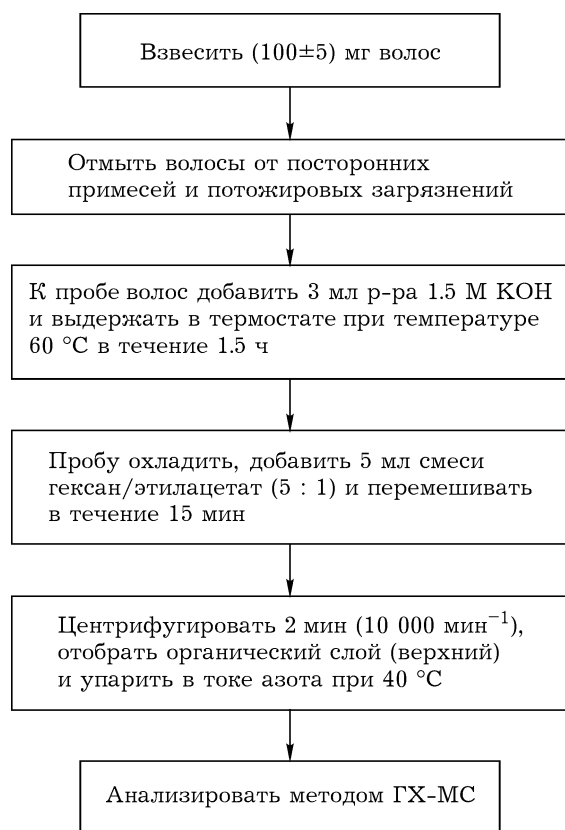


Рис. 3. Схема методики анализа амитриптилина и карбамазепина в волосах методом ГХ-МС.

Пробоподготовку и анализ приготовленного пакета контрольных проб проводили в соответствии с валидируемой методикой. Для каждой хроматограммы, полученной в режиме SIM, отмечали наличие (“+”) или отсутствие (“-”) пика целевого аналита с отношением сигнал/шум не менее 3 : 1 (см. табл. 2).

Для каждой концентрации по каждому целевому аналиту вычисляли отношение чис-

ла положительных результатов к общему числу анализов (количество “+”/5). Концентрация целевого аналита в пробе, при которой отношение числа положительных результатов к общему числу анализов равно 1 (100 %-е обнаружение), и есть ПД. Величину ПКО рассчитывали путем умножения величины ПД на 10.

Для определения линейного участка калибровочной кривой готовили набор проб, состоящий из шести бланковых образцов волос одного человека, не употреблявшего анализируемые вещества, в которые вносили целевые вещества в различном количестве и раствор внутреннего стандарта (ДФА) в количестве 1 мкг/мг. Содержание анализируемых веществ в пробах волос № 1–6 составляло 0.5, 1, 5, 10, 50 и 100 нг/мг соответственно. Приготовленные пробы исследовались по валидируемой методике трижды, затем вычисляли среднее отношение площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта и строили зависимость этих отношений от исходного содержания анализируемого вещества в волосах. Для каждого графика определяли линейный участок кривой, выводили уравнение полученной прямой и рассчитывали коэффициенты корреляции.

Для определения повторяемости с учетом погрешности прибора и пробоподготовки готовили набор из трех бланковых проб волос разных людей, в которые вносили целевые аналиты и внутренний стандарт (ДФА) в таких количествах, чтобы их содержание в волосах составляло 10 нг/мг.

Пробоподготовку и 10-кратный анализ данного набора из трех проб проводили по разработанной методике.

ТАБЛИЦА 2

Определение предела детектирования разработанной методики

Вещества	Содержание в волосах, нг/мг	Выявленный сигнал					
		–	+	+	–	–	–
Амитриптилин	0.1	–	+	+	–	–	–
	0.5	+	+	+	+	+	+
	1.0	+	+	+	+	+	+
Карбамазепин	0.1	+	–	–	+	+	+
	0.5	–	+	+	+	+	+
	1.0	+	+	+	+	+	+

Примечание. “+” – обнаружено, “–” – не обнаружено.

ТАБЛИЦА 3

Данные по расширенной повторяемости методики

Вещества	Содержание, нг/мг	$c_m$	$S_c$	$S_t$
Амитриптилин	10	17.07	3.08	18.04
Карбамазепин	10	0.12	0.03	25.87

Определяли площади пиков целевых аналитов и внутреннего стандарта в пробах. Для каждого из анализируемых веществ по всем 30 измерениям рассчитывали отношение площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта и среднее квадратическое отклонение (СКО)  $S_c$  для этих отношений:

$$S_c = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{15} (c_i - c_m)^2}{29}} \quad (2)$$

где  $c_i$  – отношение площадей пиков вещества и внутреннего стандарта, полученное при одиночном измерении;  $c_m$  – среднее отношение площадей пика целевого аналита и внутреннего стандарта по 30 пробам.

За расширенную повторяемость методики с учетом пробоподготовки для каждого аналита принимали отношение СКО, рассчитанного по формуле (2), к среднему значению площади пика целевого вещества по 30 проведенным измерениям:

$$S_t = S_c / c_m \cdot 100 \% \quad (3)$$

где  $S_t$  – среднее квадратическое отклонение для оценки расширенной повторяемости с учетом пробоподготовки. В табл. 3 представлены рассчитанные для всех целевых аналитов значения  $c_m$ ,  $S_c$  и  $S_t$ .

В ходе процедуры валидации методики установлены следующие метрологические характеристики. Предел обнаружения методики по амитриптилину составил 0.5 нг/мг, по карбамазепину – 1 нг/мг (см. табл. 2). Мето-

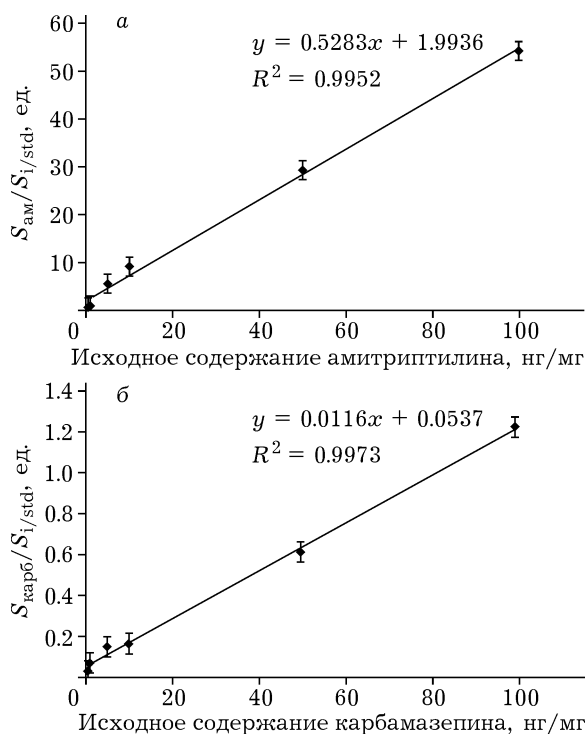


Рис. 4. Калибровочные зависимости содержания амитриптилина (а) и карбамазепина (б) в волосах.

дику можно считать прошедшей проверку на чувствительность обнаружения вещества, поскольку предел детектирования не превысил 2 нг/мг. Предел количественного определения по амитриптилину составил 5 нг/мг, по карбамазепину – 10 нг/мг.

Анализ зависимости площадей пиков аналитов от исходного содержания анализируемого вещества в волосах (рис. 4) показал, что калибровочная кривая линейна во всем диапазоне исследуемых содержаний веществ в волосах, а коэффициенты корреляции для всех исследуемых соединений составили 0.99. Таким образом, рабочий диапазон методики равен 1–100 нг/мг. Содержание целевых ве-

ТАБЛИЦА 4

Параметры детектирования анализируемых веществ

Анализируемое вещество	Время выхода, мин	Индекс Ковача	Характеристические ионы ( $m/z$ )
ДФА	13.6	1566	169.1, 168.0, 167.0,
Карбамазепин	19.6	2238	192.9, 236.0, 164.9
Амитриптилин	21.2	2265	58.0, 202.0, 215.0

ществ в образцах волос рассчитывается по следующим формулам:

$$C_{\text{ам}} = 1.89A_{\text{ам}}/A_{i/\text{std}} - 3.75 \quad (4)$$

где  $A_{\text{ам}}$  – площадь пика амитриптилина;  $A_{i/\text{std}}$  – площадь пика ДФА.

$$C_{\text{карб}} = 100A_{\text{карб}}/A_{i/\text{std}} - 5.0 \quad (5)$$

где  $A_{\text{карб}}$  – площадь пика амитриптилина.

Из данных табл. 4 видно, что величина расширенной повторяемости не превышает 25 %. Следует отметить, что, чем меньше  $S_r$ , тем повторяемость методики лучше.

Общее время, необходимое для анализа одной пробы волос по данной методике, не превышает 5 ч.

С целью апробации данной методики проанализированы 10 проб волос добровольцев, один из которых употреблял амитриптилин.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведен анализ данных по пробоподготовке волос к инструментальному анализу методом ГХ-МС. Выделены и экспериментальным путем оценены четыре основных параметра проведения пробоподготовки волос

к инструментальному анализу, варьирование которых влияет на степень извлечения лекарственных препаратов (амитриптилин и карбамазепин) из матрицы волос. С помощью приготовленных модельных образцов разработана методика анализа волос на наличие данных лекарственных препаратов. Проведена процедура валидации методики. Данная методика апробирована на волосах человека, употреблявшего амитриптилин.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Kintz P. *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair*. Boca Raton: CRC Press and Taylor & Francis, 2007. 382 p.
- 2 Villamor J. L. // *J. Anal. Toxicol.* 2005. Vol. 29. P. 135.
- 3 *Medical Application of Mass Spectrometry* // Vekey K., Telekes A., Vertes A. (Eds.) Amsterdam–Boston: Elsevier, 2008. 581 p.
- 4 Shen M. // *Forensic Sci. Int.* 2002. Vol. 126. P. 153.
- 5 Tracqui A. // *Hum. Exp. Toxicol.* 1992. Vol. 11. P. 363.
- 6 Pragst F. // *Forensic Sci. Int.* 1997. Vol. 84. P. 225.
- 7 Moeller M. R. // *SOFT Conference on Hair Analysis for Drugs of Abuse*. Washington DC: NIDA Res. Monograph Series, 1999.
- 8 Paterson S. // *J. Analyt. Toxicology.* 2001. Vol. 25. P. 203–208.
- 9 Romolo F. S. // *Forensic Sci. Int.* 2003. Vol. 84. P. 17–26.
- 10 Uhl M. // *Forensic Sci. Int.* 2000. Vol. 107. P. 169.