Разработка методик изолирования лекарственных веществ из крови в рамках реализации Приказа МЗ РФ № 933н

Моров П.В.¹, Стрелова О.Ю.², Куклин В.Н.²

¹ГБУЗ СО «Тольяттинский наркологический диспансер»

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»

Development of methods for isolating medicinal substances from blood in framework of implementation of the RF Ministry of Health Order No. 933n

Morov P.V.¹, Strelova O.Yu.², Kuklin V.N.²

¹Togliatti Narcological Dispensary

²St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University

АННОТАЦИЯ

Цель исследования — разработка методики скрининга образцов крови, прежде всего пробоподготовки, для выявления наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ в крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием (ГХ-МС) для целей реализации Приказа МЗ РФ № 933н от 18.12.2015. Разработаны и валидированы методики пробоподготовки образцов крови к скрининговым исследованиям на наличие наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ методом ГХ-МС в соответствии с требованиями Приказа МЗ РФ № 933н. Выявлено, что содержание этанола до 10 % в крови не влияет на степень экстракции токсикантов и возможность интерпретации результатов. Оценена эффективность экстракции модельных веществ из образцов крови в зависимости от метода изолирования. Установлено, что методом жидкость-жидкостной экстракции лучше изолируются соединения с высоким logP, а методом твердофазной экстракции — с низким.

Ключевые слова: валидация аналитических методик, жидкость-жидкостная экстракция, твердофазная экстракция, наркотические средства, психотропные и лекарственные вещества, кровь.

ABSTRACT

The aim of the study was to develop a method for screening blood samples, primarily sample preparation, for the detection of narcotic drugs, psychotropic and medicinal substances in the blood by gas chromatography with mass selective detection (GC-MS) for the implementation of the Ministry of Health of the Russian Federation (MH RF) Order No. 933n dated December 18, 2015. The blood sample preparation procedures for screening testing for narcotic drugs, psychotropic and medicinal substances by GC-MS method were developed and validated in accordance with the requirements of the Order No. 933n of the RF Ministry of Health. It was revealed that an ethanol content of up to 10% in the blood does not affect the extraction degree of toxicants and the possibility to interpret the results. The efficacy of the model substances extraction from blood samples was evaluated depending on the isolation method. It was found that the liquid-liquid extraction method is better for isolating compounds with high logP, and the solid-phase extraction method is better for isolating compounds with low logP.

Keywords: validation of analytical methods, liquid-liquid extraction, solid-phase extraction, narcotic drugs, psychotropic and medicinal substances, blood.

Поступила 14.01.2020
Принята 15.02.2020

*Автор, ответственный за переписку
Моров Павел Владимирович: ГБУЗ СО «Тольяттинский наркологический диспансер». 445009, г. Тольятти, ул. Победы, 28.
E-mail: evilgen1990@gmail.com

Received 14.01.2020
Accepted 15.02.2020

*Corresponding author
Morov Pavel Vladimirovich: Togliatti Narcological Dispensary, 28, Pobedy str., Togliatti, 445009, Russia.
E-mail: evilgen1990@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

В соответствии с Приказом МЗ РФ от 18.12.2015 № 933н «О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)» химико-токсикологические исследования разделены на два этапа, предварительный и подтверждающий. Подтверждающими в Приказе № 933н считаются два метода анализа: газовая хроматография с масс-спектрометрией и высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией. Однако недостаточное финансирование и, как следствие, слабый уровень оснащённости химико-токсикологических лабораторий в регионах является серьёзным препятствием для реализации требований данного Приказа.

В соответствии с данным Приказом диагностику состояния наркотического опьянения предполагается проводить в том числе и по образцам крови [1, 2]. Особенностью крови как объекта исследований являются сильные «матричные эффекты», обусловленные высоким содержанием белков, липидов и форменных элементов, взвешенных в плазме [3]. Кроме того, концентрации токсических веществ в крови, как правило, ниже, чем в моче.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка методики скрининга образцов крови, прежде всего пробоподготовки, для выявления наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ в крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием (ГХ-МС) для целей реализации Приказа МЗ РФ № 933н от 18.12.2015.

Задачи исследования:

1. Выбрать модельные вещества и провести валидацию методик количественного определения для них методом ГХ-МС.
2. Оценить эффективность широко применяемых методик пробоподготовки жидкостно-жидкостной и твердофазной экстракцией на модельных веществах.
3. Усовершенствовать методики жидкостно-жидкостной и твердофазной экстракции с целью снижения «матричного эффекта» и провести валидацию разработанных методик.
4. Апробировать разработанные методики на экспертном материале для последующего внедрения в практику работы химико-токсикологических лабораторий.

INTRODUCTION

In accordance with the Order of the Ministry of Health of the Russian Federation (MH RF) dated December 18, 2015 No. 933n “On the procedure for conducting a medical examination on the state of intoxication (alcoholic, narcotic or other toxic)”, the toxicological studies are divided into two stages, preliminary and confirmatory. Two methods of analysis are considered confirmatory in the Order No. 933n: gas chromatography with mass spectrometry and high performance liquid chromatography with mass spectrometry. However, inadequate funding and, as a result, the low level of equipment of chemical and toxicological laboratories in the regions is a serious obstacle to the implementation of this Order requirements.

In accordance with this Order, the diagnosis of drug intoxication is supposed to be carried out including blood samples [1, 2]. Blood as an object of research is peculiar for its strong “matrix effects” due to the high content of proteins, lipids and formed elements suspended in plasma [3]. In addition, the concentrations of toxic substances in blood are usually lower than in urine.

AIM OF THE RESEARCH

Development of a method for screening blood samples, primarily sample preparation, for the detection of narcotic drugs, psychotropic and medicinal substances in the blood by gas chromatography with mass selective detection (GC-MS) for the implementation of the MH RF Order No. 933n dated December 18, 2015.

Research objectives:

1. To select model substances and validate quantitative determination methods for them using GC-MS.
2. To evaluate the efficacy of widely used methods of sample preparation by liquid-liquid and solid-phase extraction on model substances.
3. To improve the methods of liquid-liquid and solid-phase extraction in order to reduce the “matrix effect” and to validate the developed procedures.
4. To test the developed methods on expert material for subsequent reduction to practice of chemical-toxicological laboratories.

MATERIALS AND METHODS

The following equipment was used to solve the tasks: the Agilent 7820A gas chromatograph with an Agilent 5977 mass selective detector, the HP-

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для решения поставленных задач было использовано следующее оборудование: газовый хроматограф Agilent 7820A с масс-селективным детектором Agilent 5977, колонка капиллярная HP-5ms (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм), управление с помощью программы MassHunter GC MS, обработка полученных данных в программе MassHunter Qualitative Analysis, AMDIS; центрифуга ЦЛМН-Р-10-01-ЭЛЕКОН. Исследования выполняли, используя в качестве модельных лекарственных веществ (МЛВ) субстанцию кофеина-натрия бензоата (фармакопейная статья (ФС) 173, Государственная Фармакопея, изд-е 10 (ГФ X)); субстанцию папаверина гидрохлорида (ФС 42-0267-07, ГФ XIII); субстанцию хинина сульфата (ФС 149, ГФ X); субстанцию анальгина (ФС. 2.1.0003.15, ГФ XIII). Также были использованы патроны для твердофазной экстракции (ТФЭ) Macherey-Nagel Chromabond HR-X с неподвижной фазой на основе дивинилполистирола и патроны для ТФЭ Macherey-Nagel Chromabond Drug II с неподвижной фазой, имеющей четвертичные аммониевые центры.

Параметры хроматографа: скорость потока газа-носителя 1.2 мл/мин (постоянный поток), температура канала ввода 270 °C, сопряжения хроматографа и детектора 310 °C. Начальная температура термостата хроматографа 70 °C, выдержка 1 мин, увеличение температуры на 30 °C в 1 мин в течение 3 мин до 150 °C, без выдержки увеличение температуры на 10 °C/мин, время выдержки 7 мин.

Параметры детектора: температура источника масс-спектрометра 230 °C, квадрупольного фильтра масс (КФМ) 150 °C. Время задержки растворителя 3.80 мин, начальная масса 40 m/z, конечная масса 650 m/z, тип сбора данных Scan, скорость сканирования $n = 2$, размер шага m/z 0.1. Обработку хроматограмм с целью идентификации компонентов проб проводили с использованием программ ChemStation G1701DA и AMDIS.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения эффективности наиболее распространенных методик пробоподготовки и их валидации нами были выбраны следующие модельные лекарственные вещества: кофеин, анальгин, хинин и папаверин. Данные МЛВ отвечают следующим требованиям: различные кислотно-основные свойства, липофильность (logP), степени связывания с белками и возможная необходимость их исследования в рамках химико-токсикологических анализов. Основа-

5ms capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), control using the MassHunter GC MS program, and processing the data obtained in the program MassHunter Qualitative Analysis, AMDIS; the centrifuge CLMN-R-10-01-ELEKON. The study was carried out using the substance of caffeine-sodium benzoate (Pharmacopoeia article (PA) 173, State Pharmacopoeia, ed. 10 (SP X)); the substance of papaverine hydrochloride (PA 42-0267-07, SF XIII); the quinine sulfate (PA 149, SP X); the substance of analgin (PA 2.1.0003.15, SP XIII) as model medicinal substances (MMS). Macherey-Nagel Chromabond HR-X solid phase extraction (SPE) cartridges with stationary phase based on divinyl polystyrene and Macherey-Nagel Chromabond Drug II cartridges for SPE with stationary phase having quaternary amine centers were also used.

Chromatograph parameters: the carrier gas flow rate 1.2 ml/min (constant flow), the inlet channel temperature 270°C, the chromatograph and detector integration temperature 310°C. The initial temperature of the chromatograph thermostat 70°C, hold-up time 1 min, ramping the temperature by 30°C in 1 min within 3 min to 150°C, without holding up, ramping the temperature by 10°C / min, hold-up time 7 min.

Detector parameters: the temperature of the mass spectrometer source 230°C, quadrupole mass filter (QMS) 150°C. Solvent retention time 3.80 min, the initial mass 40 m / z, the final mass 650 m/z, the type of data gathering is Scan, scanning speed $n = 2$, step size of m/z 0.1. Chromatograms were processed to identify sample components using the ChemStation G1701DA and AMDIS programs.

RESULTS AND DISCUSSION

To determine the efficacy of the most common methods of sample preparation and their validation, we selected the following model medicinal substances (MMS): caffeine, analgin, quinine and papaverine. These MMS meet the following requirements: various acid-base properties, lipophilicity (logP), degrees of binding to proteins and the possible need for their study in the framework of chemical toxicological analyses. The alkaloids bases were isolated from the corresponding salts.

MMS used for the study were checked for compliance with the requirements of the Pharmacopoeia articles. Since further work was performed on the GC-MS device, additional MMS were analyzed

Рис. 1. Результаты качественного анализа МЛВ методом ГХ-МС
Fig. 1. Results of qualitative analysis of MMS by GC-MS method

ния алкалоидов выделялись из соответствующих солей.

Использованные для проведения исследования субстанции МЛВ были проверены на соответствие требованиям фармакопейных статей. Так как в дальнейшем работа выполнялась на приборе ГХ-МС, дополнительно МЛВ подвергались анализу данным методом (рис. 1, табл. 1). Полученные хроматограммы и масс-спектры совпадали с базой данных прибора.

Оценка эффективности методик проводилась путем моделирования комплекса МЛВ — белки крови методом добавок. Модельные комплексы получали следующим образом: к 4 мл крови прибавляли 50 или 250 мкл раствора МЛВ в фосфатном буфере или этаноле, кровь перемешивали и получали комплекс с содержанием 20 или 100 мкг вещества в пробе. Термостатировали при 37 °C в течение 30 мин [4].

Нами были использованы следующие методики:

1. После кислотного гидролиза (к 2 мл крови добавляли 0.5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и нагревали на кипящей водяной бане 45 мин) проводили жидкость-

by this method (Fig. 1, Table 1). The resulting chromatograms and mass spectra matched the device's database.

The efficacy of the methods was evaluated by modeling the MMS — blood protein complex using the additive method. Model complexes were obtained as follows: 50 or 250 µl of MMS solution in a phosphate buffer or ethanol were added to 4 ml of blood, the blood was mixed and a complex containing 20 or 100 µg of the substance in the sample was obtained. Thermostatted at 37°C for 30 min [4].

We used the following methods:

1. After acid hydrolysis (2 ml blood added to 0.5 ml of concentrated hydrochloric acid and heated on boiling water bath for 45 min) was performed liquid-liquid extraction (LLE) by a mixture of ethyl acetate : diethyl ether (1 : 1) (3 ml, at pH = 10); after centrifugation, the organic phase was evaporated, the dry residue was dissolved in 100 µl of ethyl acetate, then derivatized with 50 µl of methylsilyltri-fluoroacetamide (MSTFA) for 20 min at 80°C and examined by GC-MS.

2. After acid hydrolysis according to the method described above, the sample was centrifuged

Таблица 1. Параметры качественного анализа оснований модельных веществ методом ГХ-МС
Table 1. Parameters of qualitative analysis of MMS bases by GC-MS method

Вещество / Substance	Время удерживания, мин Hold-up time, min	Характеристические ионы* Characteristic ions*
Кофеин / Caffeine	11.833	194 (999), 109 (721), 55 (439), 67 (438), 82 (328)
Анальгин / Analgin	15.889	123 (999), 215 (314), 56 (127), 42 (97), 122 (76)
Хинин-TMS** TMS-quinine**	18.858	136 (999), 73(202), 137 (105), 81 (55), 77 (41)
Папаверин / Papaverine	20.956	338 (999), 324 (906), 339 (761), 308 (246), 154 (209)

*В скобках указаны относительные интенсивности ионов.

In parentheses are the relative abundance of the ions.

**Из сульфата хинина выделялось основание, которое дериватизировалось до триметилсилильного эфира (TMS).
 A base was isolated from quinine sulfate which was derivatized to trimethylsilyl ether (TMS).

жидкостную экстракцию (ЖЖЭ) смесью этилацетат : диэтиловый эфир (1 : 1) (3 мл, при pH = 10); после центрифугирования органическую фазу выпаривали, сухой остаток растворяли в 100 мкл этилацетата, дериватизировали 50 мкл метилсилилтрифторацетамида (MSTFA) в течение 20 мин при 80 °C и исследовали методом ГХ-МС.

2. После кислотного гидролиза по методике, описанной выше, образец центрифугировали со скоростью 3000 об./мин в течение 5 мин и проводили твердофазную экстракцию на двух патронах по следующей методике: первый патрон Chromabond Drug II промывали последовательно водой очищенной (1 мл) и гексаном (1 мл), после чего пропускали супернатант через патрон и снова промывали водой очищенной (1 мл). В пробирке к прошедшей через патрон пробе прибавляли 4 мл аммиачного буферного раствора (pH = 10). С патрона Chromabond Drug II аналиты смывали последовательно гексаном (2 мл), спиртом этиловым 95% (2 мл). Получали элюат I.

3. Второй патрон Chromabond HR-X сначала промывали последовательно водой очищенной (1 мл) и смесью этилацетат : диэтиловый эфир (1 : 1), пропускали через патрон пробу и после промывали водой очищенной (1 мл) и 7% раствором спирта этилового (1 мл). С патрона Chromabond HR-X аналиты смывали смесью этилацетат : диэтиловый эфир (1 : 1) (4 мл). Получали элюат II. Полученные элюаты упаривали досуха в токе воздуха. Сухой остаток элюата I растворяли в 100 мкл смеси гексан : этилацетат (7 : 1), элюата II — в 100 мкл этилацетата, дериватизировали 50 мкл MSTFA в течение 20 мин при 80 °C, после чего исследовали.

На хроматограммах полученных извлечений отмечали индивидуальные пики МЛВ (кофеин — 11.83 мин, анальгин — 15.88 мин, хинин — 18.85 мин (после дериватизации до триметилсилильного эфира), папаверин — 20.95 мин) и масс-спектры, соответствующие библиотеке прибора.

Количественное определение МЛВ проводили по градуировочному графику, построенному по растворам рабочих стандартных образцов анализируемых веществ. Методики количественного определения методом ГХ-МС валидированы [4].

Исследование крови на содержание токсических веществ обладает как своими преимуществами, так и недостатками. Так, к достоинствам можно отнести возможность определения фактического их наличия в организме и концентрации в любой момент времени, а к недостаткам —

at a speed of 3000 rpm for 5 min and solid-phase extraction was performed on two cartridges according to the following method: the first Chromabond Drug II cartridge was washed sequentially with purified water (1 ml) and hexane (1 ml), after which the supernatant was passed through the cartridge and again washed with purified water (1 ml). In a test tube, 4 ml of ammonia buffer solution (pH = 10) was added to the sample passed through the cartridge. From the chromabond Drug II cartridge, analytes were washed off sequentially by hexane (2 ml) and 95% ethyl alcohol (2 ml). Eluate I was obtained.

3. The second Chromabond HR-X cartridge was first washed sequentially by purified water (1 ml) and a mixture of ethyl acetate: diethyl ether (1 : 1), a sample was passed through the cartridge and then was washed by purified water (1 ml) and a 7% solution of ethyl alcohol (1 ml). From the Chromabond HR-X cartridge, analytes were washed off by a mixture of ethyl acetate : diethyl ether (1 : 1) (4 ml). Eluate II was obtained. The resulting eluates were evaporated dry in a air current. The dry residue of eluate I was dissolved in 100 µl of a mixture of hexane : ethyl acetate (7 : 1), eluate II — in 100 µl of ethyl acetate, and with 50 µl of MSTFA was derivatized for 20 min at 80°C, after which it was examined.

Individual peaks of MMS (caffeine — 11.83 min, analgin — 15.88 min, quinine — 18.85 min (after derivatization to trimethylsilyl ether), papaverine — 20.95 min) and mass spectra corresponding to the device data library were observed on the chromatograms of the obtained extracts.

Quantitative determination of MMS was carried out according to a calibration graph plotted on solutions of working standard samples of the analyzed substances. GC-MS quantification procedures were validated [4].

Blood testing for toxic substances has both advantages and disadvantages. So, the advantages include the ability to determine their actual presence in the body and concentration at any time, and the disadvantages — the complexity of sample preparation, the strong influence of the matrix, the complexity of the destruction of the protein — toxicant complex and the isolation of lipophilic substances from plasma.

Toxicological studies are traditionally divided into 4 stages: isolation, purification, isolation of substances from purified matrices, qualitative and

сложность пробоподготовки, сильное влияние матрицы, сложность разрушения комплекса белок — токсикант и выделения липофильных веществ из плазмы.

Токсикологические исследования традиционно подразделяются на 4 этапа: изолирование, очистка, выделение веществ из очищенных матриц, качественный и количественный анализ. Наиболее важен именно первый этап токсикологического исследования — изолирование токсиканта. Это связано с тем, что именно на этом этапе возможны максимальные потери целевых аналитов, что необходимо свести к минимуму.

Для получения модельных образцов крови использовались две методики: методика получения модельного комплекса белок — токсикант, предложенная Чёгером [5], при физиологических значениях pH среды (7.35, фосфатный буфер), и модель с растворами веществ в этаноле. Результаты количественного определения МЛВ в извлечениях из обоих модельных комплексов методом жидкость-жидкостной и твердофазной экстракции представлены в табл. 2, 3. Кислотный гидролиз биологических жидкостей проводится с целью разрушения водорастворимых метаболитов, конъюгатов с глюкуроновой кислотой и повышения степени экстракции целевого токсиканта.

Из данных, представленных в табл. 2 и 3, видно, что степень экстракции из спиртового модельного комплекса и комплекса, полученного на фосфатном буферном растворе, сопоставима, различия отмечаются в пределах ошибки методики.

На хроматограммах, кроме пиков МЛВ, присутствуют пики высших жирных кислот (ВЖК): миристиновой, стеариновой, линолевой и паль-

quantitative analysis. The most important is the first stage of toxicological research — isolation of the toxicant. This is due to the fact that it is at this stage that the maximum losses of target analytes are possible, which must be minimized.

In order to obtain model blood samples, two methods were used: the method for obtaining a model protein — toxicant complex proposed by Csögör [5] at physiological pH values of the medium (7.35, phosphate buffer), and the model with solutions of substances in ethanol. The results of quantitative determination of MMS in extracts from both model complexes by liquid-liquid and solid-phase extraction are presented in Table 2, 3. Acid hydrolysis of biological fluids is performed in order to destroy water-soluble metabolites, glucuronide conjugates and increase the degree of the target toxicant extraction.

From the data presented in Table 2 and 3, it can be seen that the degree of extraction from the alcohol model complex and the complex obtained on a phosphate buffer solution is comparable, the differences are noted within the error of the method.

On the chromatograms, in addition to the peaks of MMS, there are peaks of higher fatty acids (HFA): myristic, stearic, linoleic and palmitic acids. HFA peaks can have a negative impact on the interpretation of the study results: a significant amount of HFA creates a high-intensity ion background, which makes it difficult to identify substances, and due to a significant difference in the areas of peaks, substances can be mistakenly attributed to the background, which leads to the impossibility of qualitative and quantitative analysis of them. In our case, the effect of HFA was

Таблица 2. Количественное содержание оснований МЛВ в экстрактах после изолирования методом ЖЖЭ из образцов крови, мкг/мл

Table 2. Quantitative content of MMS bases in extracts after isolation by LLE method from blood samples, µg/ml

МЛВ / MMS	Модель в фосфатном буферном растворе Model in phosphate buffer solution		Модель в этаноле Model in ethanol	
	20 мкг/мл µg/ml	100 мкг/мл µg/ml	20 мкг/мл µg/ml	100 мкг/мл µg/ml
Кофеин / Caffeine	8.46 ± 0.3 (3.58; 8.95)	5.69 ± 0.2 (3.48; 7.32)	8.12 ± 0.27 (3.52; 8.80)	5.12 ± 0.18 (3.57; 8.79)
Анальгин / Analgin	7.27 ± 0.23 (3.23; 7.91)	5.76 ± 0.24 (4.14; 9.2)	7.51 ± 0.3 (4.05; 10.11)	3.06 ± 0.085 (2.77; 6.86)
Хинин / Quinine	62.90 ± 1.19 (1.89; 4.64)	46.24 ± 1.45 (3.13; 8.28)	50.60 ± 0.84 (1.66; 4.07)	26.75 ± 0.81 (3.03; 7.44)
Папаверин / Papaverine	59.28 ± 1.27 (2.14; 5.24)	52.68 ± 1.44 (2.74; 7.25)	60.94 ± 1.18 (1.94; 4.75)	26.57 ± 0.66 (2.50; 6.13)

Примечание. В табл. 2, 3 данные представлены как среднее ± отклонение от среднего; в скобках: отклонение от среднего значения, %; коэффициент вариации, %.

Note. In Table 2, 3 data are presented as the average ± deviation from the average; in parentheses: deviation from the average value, %; coefficient of variation, %.

Таблица 3. Количественное содержание оснований МЛВ в экстрактах после изолирования методом ТФЭ из образцов крови, мкг/мл**Table 3.** Quantitative content of MMS bases in extracts after isolation by SPE method from blood samples, µg/ml

МЛВ / MMS	Модель в фосфатном буферном растворе Model in phosphate buffer solution	Модель в этаноле Model in ethanol
	20 мкг/мл µg/ml	100 мкг/мл µg/ml
Кофеин / Caffeine	8.46 ± 0.3 (3.58; 8.95)	28.47 ± 1.26 (4.44; 8.89)
Анальгин / Analgin	7.27 ± 0.23 (3.23; 7.91)	3.32 ± 0.051 (1.54; 3.01)
Хинин / Quinine	62.90 ± 1.19 (1.89; 4.64)	2.25 ± 0.35 (15.68; 31.11)
Папаверин / Papaverine	59.28 ± 1.27 (2.14; 5.24)	7.73 ± 0.37 (4.82; 9.57)

митиновой кислот. Пики ВЖК могут оказать негативное влияние на интерпретацию результатов исследования: значительное количество ВЖК создает ионный фон высокой интенсивности, что затрудняет идентификацию веществ, а также вследствие значительной разницы в площадях пиков вещества могут быть ошибочно отнесены к фону, что приводит к невозможности качественного и количественного их анализа. В нашем случае влияние ВЖК было минимально, так как разница в концентрациях между ВЖК и модельными веществами не так значительна и в данных условиях не образуются «пики-наездники» (рис. 2).

Содержание этанола до 10 % практически не влияет на степень экстракции токсикантов, а содержание этанола свыше 10 % значительно снижает эффективность изолирования. Установление данного факта является важным при проведении исследования в случаях алкогольного и медикаментозного отравления. Данные условия оптимальны для изолирования основных веществ липофильной природы. В связи с большим содержанием липидов в пробе после ЖЖЭ в основном экстракте присутствуют в значительном количестве липофильные вещества кислотного характера, что затрудняет контроль правильности проведения пробоподготовки и по-

minimal since the difference in concentrations between HFA and model substances is not so significant and “rider peaks” are not formed under these conditions (Fig. 2).

The ethanol content of up to 10% practically does not affect the degree of toxicant extraction, and the ethanol content of more than 10% significantly reduces the efficacy of isolation. The establishment of this fact is important when conducting research in cases of alcohol and drug intoxication. These conditions are optimal for isolating the main substances of lipophilic nature. Due to the high content of lipids in the sample after LLE, a significant amount of acidic lipophilic substances are present in the main extract, which makes it difficult to control the correctness of sample preparation and subsequent identification of analytes, so it became necessary to develop a technique that would reduce the content of higher fatty acids in the sample as much as possible.

After performing SPE, the chromatograms together with the peaks of the MMS bases contain peaks of myristic, stearic, and palmitic acids. Linoleic acid was not detected on all chromatograms, so the sample can be completely purified from it. During SPE, hydrophilic substances are extracted to a greater extent, which is due to the purification

Рис. 2. Хроматограмма смеси модельных веществ после пробоподготовки методом ЖЖЭ
Fig. 2. Chromatogram of a model substances mixture after sample preparation by LLE method

следующей идентификации аналитов, поэтому появилась необходимость разработки методики, которая позволила бы максимально снизить содержание ВЖК в пробе.

После проведения ТФЭ на хроматограммах совместно с пиками оснований МЛВ присутствуют пики миристиновой, стеариновой, пальмитиновой кислот. Линолевая кислота обнаруживалась не на всех хроматограммах, следовательно, проба может быть очищена от нее полностью. В ходе ТФЭ извлекаются в большей степени гидрофильные вещества, что связано в том числе с очисткой пробы от высших жирных кислот и частичным растворением в них липофильных веществ, что обуславливает их потери (рис. 3).

Разработанные методики были валидированы по следующим характеристикам:

1. Сходимость: относительное стандартное отклонение (RSD) не превышало 10 %, кроме анальгина при изолировании методом ЖЖЭ (спиртовая добавка) и хинина при изолировании методом ТФЭ (спиртовая добавка).

2. Внутралабораторная воспроизводимость: RSD не превышало 17 %.

Апробирование методик на экспертном материале происходило в соответствии с Приказом МЗ РФ № 933н от 18.12.2015 и Приказом МЗ и СР РФ от 27.01.2006 № 40 «Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ», которые регламентируют процедуры проведения токсикологических исследований живых лиц. Исследование экспертного материала, образцов крови освидетельствуемых лиц проводили по описанной выше методике ЖЖЭ и ТФЭ (рис. 4, 5). Обнаружен широкий спектр наркотических средств, психо-

of the sample from HFA and partial dissolution of lipophilic substances in them, which causes their loss (Fig. 3).

The developed methods were validated for the following characteristics:

1. Precision: the relative standard deviation (RSD) did not exceed 10%, except for analgin when isolated by LLE (alcohol additive) and quinine when isolated by SPE method (alcohol additive).

2. Intralaboratory reproducibility: RSD did not exceed 17%.

Testing of the methods on expert material was carried out in accordance with the MH RF Order No. 933n, dated December 18, 2015 and the Order of 27.01.2006 No. 40 “On organization of chemical and toxicological studies in the analytical diagnosis of the presence of alcohol, narcotic drugs, psychotropic and other toxic substances in human body” which regulate the procedures for conducting toxicological examination of living persons. The study of expert material and blood samples of the examined persons was carried out using the LLE and SPE methods described above (Fig. 4, 5). A wide range of narcotic drugs, psychotropic and medicinal substances has been detected including OH- α -pyrrolidinvalerophenone (1-phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-ol) and α -pyrrolidinvalerophenone, desomorphine, nevirapine, tramadol, cannabinal and a number of others (Fig. 6) [6].

CONCLUSION

The conducted research allows us to draw the following conclusions:

1. Procedures for sample preparation of blood specimens for screening tests for the presence of narcotic drugs, psychotropic and medicinal substances by GC-MS were developed and validated in accordance with the requirements of the MH RF Order No. 933n dated December 18, 2015.

Рис. 3. Хроматограмма смеси модельных веществ после пробоподготовки методом ТФЭ
Fig. 3. Chromatogram of a model substances mixture after sample preparation by SPE method

тропных и лекарственных веществ, включающий ОН- α -пирролидинвалерофенон (1-фенил-2-(пирролидин-1-ил)пентан-1-ол) и α -пирролидинвалерофенон, дезоморфин, невирапин, трамадол, каннабинол и ряд других (рис. 6) [6].

2. It was found that the ethanol blood content up to 10‰ does not affect the degree of toxicant extraction and the possibility to interpret the results. The efficacy of model substances extraction from blood samples was evaluated depending on the iso-

Рис. 4. Схема пробоподготовки образцов крови методом ЖЖЭ (MSTFA — метилсилилтрифторацетамид)

Fig. 4. Scheme of sample preparation of blood specimens by LLE method (MSTFA — methylsilyltrifluoroacetamide)

Рис. 5. Схема пробоподготовки образцов крови методом ТФЭ
(MSTFA — метилсилилтрифторацетамид)
Fig. 5. Scheme of sample preparation of blood specimens by SPE method
(MSTFA — methylsilyltrifluoroacetamide)

Рис. 6. Хромотограмма и масс-спектр кетамина после изолирования из крови методом ЖЖЭ
Fig. 6. Chromatogram and mass spectrum of ketamine after isolation from blood by LLE method

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволяет сделать следующие выводы:

1. Разработаны и валидированы методики пробоподготовки образцов крови к скрининговым исследованиям на наличие наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ методом ГХ-МС в соответствии с требованиями Приказа МЗ РФ № 933н от 18.12.2015.

2. Установлено, что содержание этанола до 10 % в крови не влияет на степень экстракции токсикантов и на возможность интерпретации результатов. Оценена эффективность экстракции модельных веществ из образцов крови в зависимости от метода изолирования. Выявлено, что методом ЖЖЭ лучше изолируются соединения с высоким logP, а методом ТФЭ — с низким.

3. Наиболее полное извлечение токсиканта достигается при разрушении комплекса белок крови — токсикант, для чего применяются раз-

lation method. It was revealed that compounds with a high logP were better isolated by LLE method and compounds with a low logP – by SPE method.

3. The most complete extraction of the toxicant is achieved when the blood protein — toxicant complex is destroyed, for which different methods are used, but the best results were obtained using enzymatic hydrolysis techniques [7].

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

ные методы, но наилучшие результаты были получены при использовании методик ферментативного гидролиза [7].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического): Приказ Минздрава России от 18.12.2015 N 933н. URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_195274/. Дата обращения: 25.02.2020.
2. Катаев С.С., Дворская О.Н., Крохин И.П. Оптимизация процедуры твердофазной экстракции для скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием // Суд.-мед. экспертиза. 2017. № 1. С. 29–35.

REFERENCES

1. About the procedure for conducting a medical examination for intoxication (alcoholic, narcotic or other toxic): Order of the Russia Ministry of Health No. 933n dated December 18, 2015. Retrieved on February 25, 2020 from http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_195274/. In Russ.
2. Kataev S.S., Dvorskaya O.N., Krokhin I.P. (2017). Optimization of the solid-phase extraction procedure for the screening on the medical and narcotic substances in the blood by gas chromatography with mass-spectrometric detection. *Forensic Medical Expertise*, 1, 29–35. In Russ.

3. Физиология человека: в 3 т. / пер. с англ.; под ред. Р. Шмидта, Г. Тевса. 3-е изд. М.: Мир, 2005.
4. Валидация аналитических методик: ОФС.1.1.0012.15 // Государственная Фармакопея XIII. URL: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-10012-15-validatsiya-analiticheskikh-metodik/>. Дата обращения: 25.02.2020.
5. Чёгёр С.И. Транспортная функция сывороточного альбумина: пер. с рум. Бухарест, 1975. 185 с.
6. Позднякова О.Н., Моров П.В., Михайлов С.В., Голубева Н.В. Статистика выявления наркотических и психотропных веществ в городах Тольятти, Жигулевск, Сызрань Самарской области за 2016 г. и первый квартал 2017 г. // Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами: Материалы III Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием (24–26 мая 2017 года). Пермь, 2017. 108 с.
7. Чувина Н.А. Изолирование лекарственных средств из плазмы крови с применением протеолитических ферментов: Дис. ... канд. фармацевт. наук. СПб., 2013. 165 с.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Моров Павел Владимирович — химик-эксперт клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ СО «Тольяттинский наркологический диспансер».

Стрелова Ольга Юрьевна — канд. хим. наук, доцент, заведующий кафедрой фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

Куклин Владимир Николаевич — д-р фармацевт. наук, профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

Образец цитирования: Моров П.В., Стрелова О.Ю., Куклин В.Н. Разработка методик изолирования лекарственных веществ из крови в рамках реализации Приказа МЗ РФ № 933н // Journal of Siberian Medical Sciences. 2020. № 2. С. 30–41.

3. Schmidt R.F., Thews G. (eds.) (2005). *Human Physiology: In 3 volumes*. (Trans.) Moscow: Mir.
4. Validation of analytical methods: General Pharmacopoeia Article 1.1.0012.15. State Pharmacopoeia XIII. Retrieved on February 25, 2020 from <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-10012-15-validatsiya-analiticheskikh-metodik/>. In Russ.
5. Csögör S.I. (1975). *The Transport Function of Serum Albumin* (Trans. from Romanian). Bucharest, 185 p.
6. Pozdnyakova O.N., Morov P.V., Mikhailov S.V., Golubeva N.V. (2017). Statistics on the detection of narcotic and psychotropic substances in the cities of Togliatti, Zhigulevsk, Syzran of Samara Region for 2016 and the first quarter of 2017. Problems of drugs and new psychoactive substances abuse: Materials of III All-Russia Scientific-Practical Conf. with the international participation. Perm, 108 p. In Russ.
7. Chuvina N.A. (2013). *Isolation of drugs from blood plasma with the use of proteolytic enzymes*. Cand. Sci. (Pharmaceut.). Thesis, Saint Petersburg, 165 p. In Russ.

ABOUT THE AUTHORS

Morov Pavel Vladimirovich — Consulting Chemist, Clinical Diagnostic Laboratory, Togliatti Narcological Dispensary.

Strelova Olga Yuryevna — Cand. Sci. (Chem.), Associate Professor, Head, Department of Pharmaceutical Chemistry, St. Petersburg Chemical Pharmaceutical University.

Kuklin Vladimir Nikolaevich — Dr. Sci. (Pharmaceut.), Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, St. Petersburg Chemical Pharmaceutical University.

Citation example: Morov P.V., Strelova O.Yu., Kuklin V.N. (2020). Development of methods for isolating medicinal substances from blood in framework of implementation of the RF Ministry of Health Order No. 933n. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 2, 30–41.