

**ПРИМЕНЕНИЕ ХОЛОДОВОГО КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ПРИ АНАЛИЗЕ
БИОЖИДКОСТЕЙ, ЗАБОР КОТОРЫХ ОСУЩЕСТВЛЯЛСЯ ПОСЛЕ ОКОНЧАНИЯ
ПЕРИОДА ПОЛУВЫВЕДЕНИЯ, НА ПРЕДМЕТ НАЛИЧИЯ
МЕТИЛЕНДИОКСИМЕТАМФЕТАМИНА**

Тяжелников С.Ф.

ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия», Пермь, Россия (614000, г. Пермь, ул. Екатерининская, 101), e-mail: info@pfa.ru

В статье описаны основные подходы, применяемые автором для повышения чувствительности определения метилendioксиметамфетамина (MDMA) в биологических матрицах при позднем заборе пробы. Исследовались две пробы мочи. Проба 1 забиралась через 8 часов после предположительного употребления MDMA, и подтверждался факт употребления. Также было установлено, что существующих методик достаточно для надежного определения MDMA в моче при раннем заборе пробы. Проба 2 забиралась через 56 часов после употребления, подтвержденного ранее. В первой серии опытов использовались классические методики дериватизации. Было установлено, что они не могут достоверно и надежно установить факт употребления рекреационных доз MDMA. Во второй серии опытов в процедуру пробоподготовки включали однократное холодное концентрирование. Было установлено, что аналитический сигнал (соотношение пика искомого вещества к пикам примесей) становился достоверно сильным, но надежность такой процедуры все еще была не достаточно надежной. В третьей серии опытов использовали двукратное холодное концентрирование. Было установлено, что в этом случае сила аналитического сигнала достаточна для надежного и достоверного подтверждения употребления MDMA.

Ключевые слова: MDMA, экстази, холодное концентрирование.

**APPLICATION OF THE CONCENTRATION OF THE COLD IN THE BIOLIQUIDS
ANALYSIS, THE FENCE WHICH WAS CARRIED UOT AFTER THE HALF-LIFE, FOR
THE PRESENCE OF METHYLENEDIOXYMETHAMPHETAMINE**

Tyazhelnikov S.F.

Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia (614000, Perm, Ekaterininskaya st., 101), e-mail: info@pfa.ru

The article describes the main approaches used by the author to improve the sensitivity of determination of methylenedioxyamphetamine (MDMA) in biological matrices at later sampling. We studied two samples of urine. Sample 1 climbed 8 hours after the alleged use of MDMA and confirmed by the fact of use. It was also found that the existing methods are sufficient for reliable determination of MDMA in urine for early sampling. Sample 2 climbed by 56 hours after ingestion, confirmed earlier. In the first series of experiments used the classic technique derivatization. It was found that they cannot be reliably and robustly establish the fact of the use of recreational doses of MDMA. In the second series of experiments in the sample preparation procedure included a single concentration of the cold. It was found that the analytical signal (the ratio of the peak of the desired substance to the peaks of impurities) has become significantly stronger, but the reliability of this procedure was still not reliable enough. In the third series of experiments used a two-fold concentration of cold. It was found that in this case, the analytical signal strength is sufficient for secure and reliable confirmation of the use of MDMA.

Key words: MDMA, ecstasy, concentration of cold.

Введение

Определение в биожидкостях веществ, концентрация которых ниже порога определения современных приборов, является достаточно сложной задачей. Современная практика предлагает в данном случае несколько решений. В западных странах часто используют ферментативный гидролиз конъюгатов с последующим проведением

твердофазной экстракции. В России эти методы не имеют широкого распространения в связи с высокой стоимостью расходных материалов.

Другим возможным вариантом повышения чувствительности при анализе сильно разбавленных растворов является увеличение объема пробы, взятой для жидкостно-жидкостной экстракции. В данном случае возникает проблема большого количества балластных веществ, экстрагируемых в слой органического растворителя, что приводит к значительным сложностям в ходе качественного и количественного определения. Метод выпаривания позволяет проводить концентрирование, но в данном случае возникает риск улетучивания, разрушения веществ в процессе нагревания. Метод вакуумной отгонки требует специализированного оборудования, занимает длительное время, и также существует риск улетучивания искомым веществ с парами воды.

В предыдущих экспериментах нами была разработана и изучена методика холодого концентрирования разбавленных водных растворов неорганических и органических веществ, мочи здорового человека, модельных образцов мочи, а также реальных образцов мочи, содержащих различные токсикологически значимые вещества [1].

Суть метода холодого концентрирования заключается в контролируемом частичном замораживании части жидкости, так что растворенные вещества концентрируются в жидкой фазе. Оптимальной температурой морозильной камеры является $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$, материал сосудов – стекло, соотношение высоты/диаметра сосуда порядка 1.

При изучении холодого концентрирования образцов мочи было установлено, что высокомолекулярные липофильные вещества, содержащиеся в моче наркоманов в большом количестве, обычно в значительной степени попадают в твердую, ледяную фракцию. Это вызвано тем, что уже при охлаждении мочи до $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ липидоподобные вещества, растворенные в моче, превращаются в эмульсию. На границе лед/вода воскоподобные частицы переохлажденной эмульсии легко включается в структуру растущего льда. Благодаря тому что моча является раствором многих веществ, растущие кристаллы льда являются мелкими и обычно неправильной формы, а значит площадь поверхности соприкосновения лед/вода достаточно велика.

Именно фактор большой площади контакта фаз является основной причиной включения липидоподобных веществ в структуру льда. Таким образом, в рекомендованном диапазоне температур ($-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$) происходит значительная очистка пробы от липидоподобных веществ без существенной потери аналитов [2].

Цель исследования

На основе приведенных выше преимуществ методики холодного концентрирования разработать методику определения метилendioксиметамфетамина в пробах, забор которых производился после окончания периода полувыведения вещества, когда имеющиеся широко распространенные методы не позволяют надежно установить факт употребления MDMA.

Экспериментальная часть

Реагенты. Две пробы мочи были взяты у лица, предположительно употребившего MDMA. Образец 1 был взят через 8 часов после употребления, образец 2 – через 56 часов.

Раствор для гидролиза конъюгатов содержал хлороводородную кислоту. Для осаждения балластных веществ использовали раствор трихлоруксусной кислоты.

Экстракция из биоматериала проводилась в слой хлороформа.

Методы. Определение проводилось посредством газо-жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием.

Инструментарий. Газо-жидкостный хроматограф с масс-селективным детектором Agilent 7890/5975с. Температура инжектора – 170 °С, температура интерфейса – 220 °С. Температура колонки программно изменялась от 70 °С – 1,5 мин, с последующим увеличением температуры со скоростью 5 °С/мин до 230 °С. Колонка HP 5 MS (30 м×0,25 мм толщина неподвижной фазы 0,25 мкм). Газ-носитель: гелий.

Проведение анализа. В серии из трех опытов 20 мл пробы 1 помещали в стеклянный стакан, рН доводили до 2 раствором хлороводородной кислоты, после чего пробу выдерживали на водяной бане 30 минут. После охлаждения смеси к ней добавляли 3 мл раствора трихлоруксусной кислоты для осаждения балластных веществ. Затем проводили трехкратную экстракцию в слой хлороформа. Экстракт упаривали, сухой остаток растворяли в 0,5 мл хлороформа. Концентрат исследовали с помощью ГХ МС. На хроматограмме наблюдали четкий пик, идентифицированный как 1-(бензо[1,3]диоксол-5-ил)-N-метилпропан-2-амин.

Таким образом, было установлено, что человек употребил именно MDMA.

Далее проводилось исследование пробы 2.

В серии из трех опытов 20 мл пробы II помещали в стеклянный стакан, рН доводили до 2 раствором хлороводородной кислоты, после чего пробу настаивали на водяной бане 30 минут. После охлаждения смеси к ней добавляли 3 мл раствора трихлоруксусной кислоты для осаждения балластных веществ. Затем проводили трехкратную экстракцию в слой хлороформа. Экстракт упаривали, сухой остаток растворяли в 0,5 мл хлороформа. Концентрат исследовали с помощью ГХ МС. На хроматограмме наблюдали пик, идентифицированный как 1-(бензо[1,3]диоксол-5-ил)-N-метилпропан-2-амин, но его размер

был сравним с размером пиков балластных веществ. Найти пик получилось только после изменения схемы интегрирования хроматограммы таким образом, что исследовались даже самые небольшие пики.

Для повышения чувствительности определения MDMA в моче применяли метод холодного концентрирования.

В серии из трех опытов 100 мл пробы II наливали в химический стакан, который помещали в морозильную камеру при $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. После начала образования льда на поверхности жидкости каждые 10 минут верхний слой разрушали. После замерзания $2/3$ жидкости пробу доставали из морозильной камеры, сливали не замерзшую жидкость. К пробе добавляли раствор хлороводородной кислоты до pH 2, помещали на водяную баню на 30 минут. После охлаждения раствора добавляли 3 мл трихлоруксусной кислоты и проводили трехкратную экстракцию в слой хлороформа. Полученное извлечение упаривали, сухой остаток растворяли в 0,5 мл хлороформа. Концентрат исследовали с помощью ГХ МС. На хроматограмме наблюдали небольшой пик, идентифицированный как 1-(бензо[1,3]диоксол-5-ил)-N-метилпропан-2-амин.

Для бóльшего повышения чувствительности и надежности метода исследовалось двукратное холодное концентрирование.

В серии из двух опытов 300 мл пробы II наливали в 3 стакана объемом 100 мл и помещали в морозильную камеру при температуре $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. После начала образования льда на поверхности жидкости каждые 10 минут верхний слой разрушали. После замерзания $2/3$ жидкости пробу доставали из морозильной камеры, сливали не замерзшую жидкость. Пробы объединяли и помещали в морозильную камеру при $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, после замерзания $2/3$ раствора незамерзшую жидкость сливали. Концентрат доводили до pH 2 раствором хлороводородной кислоты и помещали на водяную баню на 30 минут. После охлаждения к пробе добавляли 3 мл трихлоруксусной кислоты и доводили pH до 9 раствором гидроксида аммония 30%. После трехкратной экстракции в слой хлороформа полученное извлечение упаривали на воздухе, сухой остаток растворяли в 0,5 мл хлороформа. Концентрат исследовали с помощью ГХ МС (рис. 1, 2).

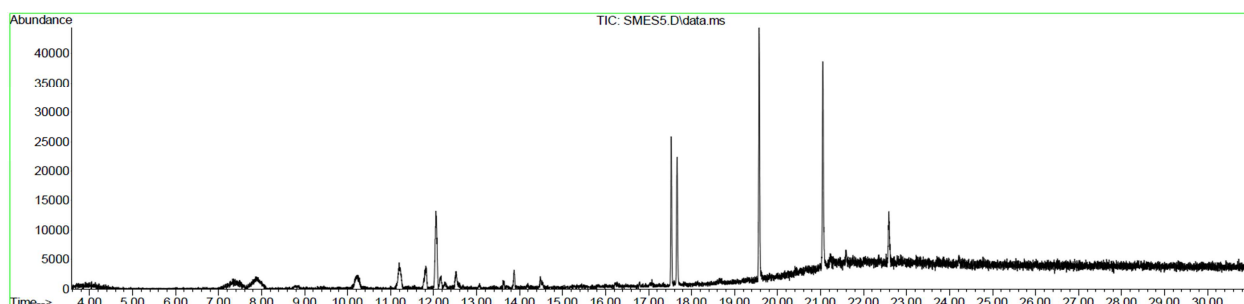


Рис. 11. Пример хроматограммы MDMA после холодного концентрирования.

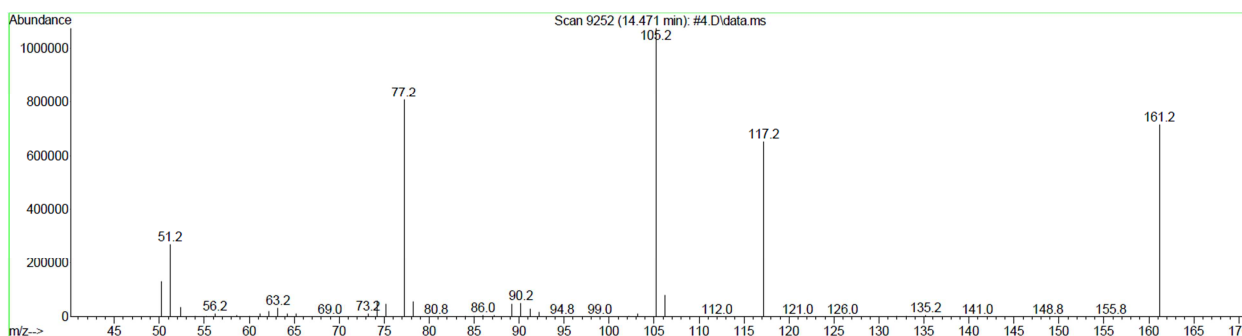


Рис. 2. Масс-спектр MDMA.

На полученных хроматограммах присутствовал пик, идентифицированный как 1-(бензо[1,3]диоксол-5-ил)-N-метилпропан-2-амин. Площадь пика была достаточно большой, так что при соответствующей калибровке возможно проведение как качественного, так и количественного определения MDMA.

Выводы

Исходя из полученных результатов следует, что при анализе мочи, забор которой производился непосредственно в период активного выведения MDMA из организма, существующих методик достаточно для определения его в моче. В случае более позднего забора мочи существующие методики не могут обеспечить достаточно точное и надежное определение MDMA.

Предложенная нами усовершенствованная методика пробоподготовки включает в себя дополнительно этап холодового концентрирования.

Холодовое концентрирование – это процесс, который был изначально разработан нами для определения термолабильных алкалоидов группы псилоцина. Он позволяет повышать концентрацию искомым веществ без нагревания и существенного разрушения бóльшей части термолабильных компонентов. После успешного внедрения методики в анализ псилоцибина и псилоцина мы изучали возможность её применения в анализе других веществ, концентрация которых в пробе относительно мала. Это, прежде всего, случаи определения токсикологически значимых веществ, которые употребляются в дозировке менее 5 мг в сутки (например, клофелин, 2С-Е, варфарин и т.д.), а также случаи, когда забор пробы производился после периода выведения бóльшей части искомым веществ.

Методика отличается параллельной очисткой от балластных веществ и небольшими потерями – 5–10% в зависимости от физико-химических свойств искомым веществ.

Однократное холодовое концентрирование позволяет повысить чувствительность определения метилendioксиметамфетамина. Тем не менее из-за чрезвычайно низкой

концентрации аналитов надежность такой методики ниже, чем необходимо для выдачи обоснованных и однозначных результатов анализа.

Двукратное холодное концентрирование позволяет значительно повысить чувствительность определения, но требует использования значительных объемов пробы – порядка 300 мл, что не всегда является возможным.

Полученные данные говорят о рациональности применения двукратного холодного концентрирования для надежного определения MDMA в моче при заборе пробы не позднее 56 часов после употребления наркотика. При отсутствии достаточных объемов биоматериала допустимо использование однократного холодного концентрирования, но в таком случае определение будет менее надежным, концентрации аналита не всегда достаточны для достоверного определения. Успех зависит от количества употребленного наркотика и от индивидуальных особенностей метаболизма.

Список литературы

1. Тяжелников С.Ф. Модернизация процедуры пробоподготовки и скрининга биологического материала, содержащего алкалоиды грибов рода *Psilocybe* // Наркология. – 2011. – № 2. – С. 85-87.
2. Тяжелников С.Ф. Психоделики. Общая информация и методики анализа : монография. – Пермь : Типография ПГФА, 2012. – ISBN 978-5-91247-062-2.
3. Barnes A.J. [et al.] Disposition of MDMA and metabolites in human sweat following controlled MDMA administration // *Clinical chemistry*. – 2009. – 55 (3): 454–62.
4. Baselt R. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. – 9th edition. – Biomedical Publications, Seal Beach, California, 2011. – P. 1078–1080.
5. Kolbrich EA [et al.] Plasma pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxyamphetamine after controlled oral administration to young adults // *Ther. Drug Monit.* – 2008. – 30: 320–332.

Рецензенты

Коротаев Владимир Николаевич, доктор технических наук, профессор, проректор по науке и инновациям ФГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», г. Пермь.

Вайсман Яков Иосифович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой охраны окружающей среды ФГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», г. Пермь.