УДК 616-091.818

ЭКСТРАКЦИОННОЕ ВЫМОРАЖИВАНИЕ В ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ПОДГОТОВКЕ БИОПРОБ ДЛЯ ГХ-МС АНАЛИЗА

В. Н. Бехтерев [1,2,3], С. Н. Гаврилова [3], И. Н. Шипанов [3]
[1]Северо-Кавказский федеральный научно-клинический центр, г.Сочие
[2]Сочинский государственный университет, г.Сочи
[3]Бюро СМЭ № 2 министерства здравоохранения Краснодарского края, г.Сочи

Ключевые слова: печень, почки, пробоподготовка, экстракционное вымораживание, ГХ-МС.

Аннотация. Предложен низкотемпературный экспресс-метод пробоподготовки, основанный на использовании экстракционного вымораживания в комбинации с центрифугированием пробы в качестве этапа предварительной подготовки биообъекта (печень, почки от трупа). Способ позволил значительно снизить «химический фон» эндогенных коэкстрактивных веществ и существенно улучшить условия ГХ-МС исследования.

EXTRACTION FREEZING-OUT IN PRELIMINARY PREPARATION OF BIOSAMPLES FOR GC-MS ANALYSIS

V.N. Bekhterev [1,2,3], S.N. Gavrilova [3], I.N. Shipanov [3]
[1]"North Caucasus Federal scientific clinical center", Sochi
[2]Sochi state University, Sochi
[3]FME Bureau № 2 of the Ministry of healthcare of Krasnodar region, Sochi

Keywords: liver, kidney, sample preparation, extractive freezing-out, GC-MS

Annotation. A low-temperature rapid method of sample preparation is proposed, based on the use of extractive freezing-out in combination with centrifugation of the sample as a stage of preliminary preparation of the biological object (liver from the corpse). The method significantly reduced the «chemical background» of endogenous co-extractives and significantly improved the conditions of GC-MS research.

Введение. Сложный химический состав биологических проб обуславливает многостадийность фармакологического анализа и биохимической диагностики. Использованию современных систем физико-химической идентификации в данной области медицины посвящено значительное количество работ в нашей стране и за рубежом [1-3]. В виду высокой специфичности и чувствительности широкое распространение получает газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС). Однако, предварительная подготовка проб к этапу инструментального исследования, как правило, ограничена жидкостной и твердофазной экстракцией [2-6]. По этой причине актуален поиск новых подходов к пробоподготовке биопроб.

Предложенный нами метод экстракционного вымораживания (ЭВ) [7,8], extractive freezing-out (EF) [9,10] в качестве этапа пробоподготовки активно набирает свое практическое применение в фармакологических, химико-токсикологических исследованиях [11-14]. Способ, сочетающий экстракцию с вымораживанием, основан на низкотемпературном извлечении целевых компонентов, использующем их перераспределение между жидкой органической фазой ранее добавленного незамерзающего органического растворителя и твердой фазой льда во время замораживания пробы [7,8,15].

Необходимо добавить, что применение способа ЭВ в сочетании с центрифугированием (ЭВЦ) [8,16] за счет значительного снижения доли экстрагента в экстракционной системе позволяет даже в результате однократной процедуры в 25–30 раз концентрировать целевые вещества в получаемом экстракте [16]. Метод ЭВЦ, сохранив преимущества ЭВ над твердофазной и жидкостной экстракцией, еще более эффективен в анализе дисперсных проб и улучшает воспроизводимость результатов анализа. Кроме того, получаемые экстракты практически не содержат воды, т.к. экстракцию ведут при температурах ниже (минус) – 28°С, а растворимость воды в ацетонитриле при этой температуре менее 4%. Следовательно, минуя высушивание, они сразу могут быть проанализированы с помощью газовой хроматографии без риска для хроматографической колонки. Это существенно ускоряет анализ, снижая погрешность определения целевых компонентов, в том числе, и за счет сокращения стадий пробоподготовки.

Целью настоящей исследования было изучение возможности сочетания экстракционного вымораживания в условиях действия центробежных сил (ЭВЦ) в качестве этапа предварительной подготовки биопробы с газовой хромато-масс-спектрометрией.

Методы и организация исследования. Исследовали образцы трупного материала (печень и почки). ГХ-МС анализ экстрактов вели на аналитическом комплексе-хроматографе «Маэстро» (Interlab) с масс-селективным детектором Agilent Technologies 5975 в стандартных условиях энергии ионизации 70 эВ. Использовали разделительную капиллярную колонку HP-5MS, длиной 30м, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм. Скорость газа-носителя гелия 1 мл/мин, деление потока 1:20. Температура инжектора 300°С, интерфейса 280°С. Нагрев колонки сразу после инжекции от 100 до 290°С с градиентом 10°С/мин.

Извлечение целевых компонентов из биологического материала вели методами жидкостной экстракции [4] и экстракционного вымораживания в условиях одновременного центрифугирования пробы с использованием криоэкстрактора-центрифуги ЭВЦ-1 (ООО «Химбиомед», Сочи, РФ) [8,14]. Предварительная подготовка биопробы в соответствии с [4] включала кислотный гидролиз 15 г. биоматериала с добавлением смеси 10 мл дистиллированной воды и 3,5 мл концентрированной соляной кислоты в толстостенной стеклянной колбе с притертой пробкой при нагревании в автоклаве в течение 45 мин. Гидролизат охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через складчатый фильтр, который дополнительно промывали 2 мл соляной кислоты (6N). Из полученного фильтрата брали аликвоты по 3мл вытяжки. Одну из них подвергали жидкостной экстракции этоксиэтаном, упаривание экстракта досуха с последующим растворением сухого остатка в 0,3 мл. этилацетата. А с другой, поместив в пенициллиновый флакон с добавлением 1 мл ацетонитрила, провели ЭВЦ. После этого осуществляли этап ГХ-МС-исследования экстракта.

Результаты исследования и их обсуждение. Из сравнения полученных хроматограмм установлено, что применение ЭВЦ вместо жидкостной экстракции позволило, практически, полностью устранить «химический фон» эндогенных коэкстрактивных веществ, наблюдаемый в диапазоне времен удерживания 17 – 25 мин. Это благоприятно отражается возможности детектирования аналитов, увеличивая параметр-отношение «сигнал/шум», а также на работоспособности разделительной системы хроматографа. Следует ожидать увеличения срока работы МС-детектора между фазами технического обслуживания. Так как извлечение аналитов производится в одну стадию, то сокращается и время выполнения анализа.

Установленный факт был использован для решения конкретной судебно-химической экспертизы в Бюро СМЭ г.Сочи, куда осенью 2017г. был доставлен труп мужчины. Обстоятельства гибели и оперативные данные следственных органов говорили о том, что при жизни погибший принимал наркотические вещества. Вместе с тем, на ГХ-МС-хроматограмме извлечения из почки от трупа среди большого количества хроматографических максимумов не удалось, опираясь на доступные библиотеки данных масс-спектров NIST, SUDMED_NNCN и AMDLIB, идентифицировать какие-либо вещества наркотического характера. В районе времен удерживания от 15 до 26 мин наблюдался интенсивный «фоновый шум» эндогенных

коэкстрактивных веществ.

На основании из ранее полученного положительного опыта сочетания ЭВЦ с ГХ-МС было принято решение применить на стадии предварительной подготовки пробы в данном конкретном случае метод ЭВЦ. Удалось значительно подавить уровень «химического шума» эндогенных коэкстрактивных веществ. В результате, используя базы данных масс-спектров SUDMED и EKBDRUGS с высокой степенью достоверности (более 90% совпадение спектра ионов) вещество с временем удерживания 15,764 мин было идентифицировано в качестве кетамина, препарата, применяемого в медицине и ветеринарии средством для наркоза.

Заключение. Таким образом, применение в пробоподготовке биопроб метода экстракционного вымораживания с центрифугированием позволяет значительно уменьшить фон коэкстрактивных веществ, сократить количество проводимых манипуляций с пробой. Это уменьшает погрешность результатов исследования. За счет снижения «химического фона» улучшается надежность ГХ-МС-идентификации. Кроме того, получаемые методом ЭВЦ экстракты при использовании ацетонитрила, практически не содержат воды и дисперсных частиц. По этой причине не требуется ни осушающих агентов, ни этапа фильтрования пробы. Это сокращает время пробоподготовки и сроки анализа, в целом. Улучшены условия труда, т.к. исследование выполняется с минимальным количеством экстрагента и при низких температурах, существенно снижая летучесть применяемых растворителей. В итоге, все это позволяет рекомендовать метод ЭВЦ для использования в фармакологических экспериментальных исследованиях, химико-экспертной работе, в т.ч. с использованием ГХ-МС техники.

Список литературы

1. Шевырин В.А. Синтетические каннабиноиды в качестве новых психоактивных соединений. Установление структур, аналитические характеристики, методы определения и идентификации в объектах анализа наркотических средств. / В.А. Шевырин - М: Издательство «Перо», 2015. – 608 с.

2. Темердашев А.З. Скрининг и определение некоторых наркотических и психоактивных веществ в материалах природного и синтетического происхождения хроматографическими методами: Автореф. дис. к.х.н. – Краснодар. - 2015. – 24 с.

3. Sauer C. New designer drug *α*-pyrrolidinovalerophenone (PVP): studies on its metabolism and toxicological detection in rat urine using gas chromatographic/mass spectrometric techniques. / C. Sauer // .J. Mass. Spectrom. - 2009. - № 44. – p. 952-964.

4. Швайкова М.Д. Токсикологическая химия. / М.Д. Швайкова - Изд. 3-е, испр. – М.: Медицина, 1975. - 376 с.

5. Еремин С.К. Анализ наркотических средств: Руководство по химико-токсикологическому анализу наркотических и других одурманивающих средств / С.К. Еремин, Б.Н. Изотов, Н.В. Веселовская // М.: Издательство «Мысль». - 1993. – 270 с.

6. Мелентьев А.Б. Дизайнерские наркотики. Метаболизм и подходы к анализу в биологических средах. / А.Б. Мелентьев, С.С. Катаев, О.Н. Дворская // М.: Издательство «Перо». - 2016. – 326 с.

7. Бехтерев В.Н. Способ извлечения органических веществ из водных сред экстракцией в сочетании с вымораживанием // Патент России № 2303476. 2007. Бюл. № 21

8. Бехтерев В.Н. Способ извлечения органических веществ из водных сред экстракционным вымораживанием в поле центробежных сил // Патент России №2564999. 2015. Бюл. №28.

9. Bekhterev V.N. Extractive freezing-out in the analysis of organic compounds in the aqueous mediums / V.N. Bekhterev // Mendeleev Communications. - 2007. - V. 17. - P. 241-243.

10. Бехтерев В.Н. Выделение фенолов из воды экстракционным вымораживанием / В.Н. Бехтерев // Журнал аналитической химии. - 2008. - Т.63. - №10. - С. 1045-1049.

11. Бехтерев В.Н., Использование экстракционного вымораживания для решения фармакологических и биохимических задач / В.Н. Бехтерев, С.Н. Гаврилова, Е.В. Кошкарева // Химико-фармацевтический журнал. - 2008. - т. 42. - №2. - С. 44-46

12. Бехтерев В.Н. Использование экстракционного вымораживания для анализа 1,4-бензодиазепинов в моче / В.Н. Бехтерев, С.Н. Гаврилова, И.В. Маслаков // Судебно-медицинская экспертиза. - 2007. - № 2. - С. 32-35.

13. Бехтерев В.Н. Экспресс-определение кофеина в крови методом экстракционного вымораживания / В.Н. Бехтерев, С.Н. Гаврилова, Е.П. Козина, И.В. Маслаков // Судебно-медицинская экспертиза. - 2010. - № 5. - С. 22-24.

14. Бехтерев В.Н. Газохроматографическое определение пировалерона в моче методом экстракционного вымораживания в сочетании с центрифугированием / В.Н. Бехтерев, С.Н. Гаврилова, Е.В. Кошкарева, И.Н Шипанов // Судебно-медицинская экспертиза. - 2017. - Т. № 3. - С. 27-31.
15. Бехтерев В.Н. Закономерности поведения растворенных органических веществ в условиях экстракционного вымораживания / В.Н. Бехтерев // Журнал аналитической химии. - 2011. - Т. 66(6). - С. 608-613.
16. Бехтерев В.Н. Экстракционное вымораживание одноосновных карбоновых кислот из воды в ацетонитрил в условиях действия центробежных сил / В.Н. Бехтерев // Журнал физической химии. - 2016. - Т.90(10). - С.1558-1562

References

1. Shevyrin V.A. Synthetic cannabinoids as new psychoactive compounds. Establishment of structures, analytical characteristics, methods for determining and identifying in the objects of analysis of narcotic drugs. / V.A. Shevyrin - M: Perot Publishing House, 2015. - 608 p.
2. Temurdashev A.Z. Screening and determination of certain narcotic and psychoactive substances in materials of natural and synthetic origin by chromatographic methods: Author's abstract. dis. Ph.D. - Krasnodar. - 2015. - 24 p.
3. Sauer C. New designer drug α-pyrrolidinovalerophenone (PVP): studies on its metabolism and toxicological detection using gas chromatographic / mass spectrometric techniques. / C. Sauer // .J. Mass. Spectrom. - 2009. - No. 44. - p. 952-964.
4. Shvaykova MD Toxicological chemistry. / M.D. Shvaykova - Ed. 3rd, rev. - M .: Medicine, 1975. - 376 p.
5. Eremin S.K. Analysis of narcotic drugs: Guidelines for chemical-toxicological analysis of narcotic and other intoxicating agents / S.K. Eremin, B.N. Izotov, N.V. Veselovskaya // M.: Thought Publishing House. - 1993. - 270 p.
6. Melent'ev, A.B. Designer drugs. Metabolism and approaches to analysis in biological media. / A.B. Melentiev, S.S. Kataev, ON Dvorskaya // M.: Perot Publishing House. - 2016. - 326 p.
7. Bekhterev V.N. The method of extraction of organic substances from aqueous media by extraction in combination with freezing // Patent of Russia No. 2303476. 2007. Bull. Number 21
8. Bekhterev V.N. Method of extracting organic matter from aqueous media by extraction by freezing in the field of centrifugal forces // Patent of Russia No. 2564999. 2015. Bull. №28.

9. Bekhterev V.N. In the aqueous mediums / V.N. Bekhterev // Mendeleev Communications. - 2007. - V. 17. - P. 241-243.
10. Bekhterev V.N. Extraction of phenols from water by extraction by freezing / V.N. Bekhterev // Journal of Analytical Chemistry. - 2008. - T.63. - №10. - p. 1045-1049.
11. Bekhterev V.N., Use of extraction freezing for solving pharmacological and biochemical problems / V.N. Bekhterev, S.N. Gavrilova, E.V. Koshkareva // Journal of Chemical Pharmaceuticals. - 2008. - V. 42. - №2. - p. 44-46
12. Bekhterev V.N. Use of extraction freezing for analysis of 1,4-benzodiazepines in urine / V.N. Bekhterev, S.N. Gavrilova, I.V. Maslakov // Forensic medical examination. - 2007. - № 2. - p. 32-35.
13. Bekhterev V.N. Rapid determination of blood caffeine by the method of extraction freezing / V.N. Bekhterev, S.N. Gavrilova, E.P. Kozina, I.V. Maslakov // Forensic medical examination. - 2010. - № 5. - p. 22-24.
14. Bekhterev V.N. Gas chromatographic determination of piroperone in urine by the method of extraction freezing combined with centrifugation / V.N. Bekhterev, S.N. Gavrilova, E.V. Koshkareva, I.N. Shipanov // Forensic Medical Examination. - 2017. - T. № 3. - p. 27-31.
15. Bekhterev V.N. Patterns of behavior of dissolved organic substances under conditions of extraction freezing / V.N. Bekhterev // Journal of Analytical Chemistry. - 2011. - T. 66 (6). - p. 608-613.
16. Bekhterev V.N. Extraction freezing of monobasic carboxylic acids from water into acetonitrile under the action of centrifugal forces / V.N. Bekhterev // Journal of physical chemistry. - 2016. - T.90 (10). - P.1558-1562

Сведения об авторах: Виктор Николаевич Бехтерев - Главный научный сотрудник «Северо-Кавказского федерального научно-клинического центра», профессор кафедры инженерно-экологического факультета Сочинского государственного университета; эксперт-химик Бюро СМЭ № 2 министерства здравоохранения Краснодарского края vic-bekhterev@yandex.ru, **Светлана Николаевна Гаврилова** - заведующая отделом Бюро СМЭ № 2 министерства здравоохранения Краснодарского края, chimikjuk@mail.ru, **Игорь Николаевич Шипанов** - начальник Бюро СМЭ № 2 министерства здравоохранения Краснодарского края, sochi@sudmed.info