УДК 615.91
https://doi.org/10.29296/25877313-2022-04-03
© Коллектив авторов, 2022

ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАЛЕПЛОНА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ В БИОЛОГИЧЕСКОМ ОБЪЕКТЕ МОЧЕ

А.А. Волкова
к.фарм.н., вед. науч. сотрудник, лаборатория судебно-химических и химико-токсикологических исследований,
отдел судебно-химических и химико-токсикологических экспертиз,
ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы»;
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Москва, Россия)
https://orcid.org/0000-0002-9882-2330
Р.А. Калёкин
д.фарм.н., зав. лабораторией судебно-химических и химико-токсикологических исследований,
отдел судебно-химических и химико-токсикологических экспертиз,
ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы»;
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Москва, Россия)
https://orcid.org/0000-0002-4989-3511
E-mail: himija@rc-sme.ru
А.М. Орлова
к.фарм.н., вед. науч. сотрудник, лаборатория судебно-химических и химико-токсикологических исследований,
отдел судебно-химических и химико-токсикологических экспертиз?
ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» (Москва, Россия)
https://orcid.org/0000-0002-5419-1418
Н.Е. Москалева
к.б.н., вед. науч. сотрудник, лаборатория судебно-химических и химико-токсикологических исследований,
отдел судебно-химических и химико-токсикологических экспертиз, ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы»;
ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет)
(Москва, Россия)
https://orcid.org/0000-0002-7309-8913
П.А. Маркин
мл. науч. сотрудник, лаборатория судебно-химических и химико-токсикологических исследований,
отдел судебно-химических и химико-токсикологических экспертиз, ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы»;
ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет)
(Москва, Россия)
https://orcid.org/0000-0002-2240-2903
О.Г. Асташкина
д.м.н., гл. науч. сотрудник, лаборатория судебно-химических и химико-токсикологических исследований,
отдел судебно-химических и химико-токсикологических экспертиз, ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы»;
ГБУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы» Департамента здравоохранения Москвы (Москва, Россия)
https://orcid.org/0000-0002-0000-8956

Актуальность. Производные бензодиазепинов являются психоактивными веществами, модуляторами рецепторов *гамма*-аминомасляной кислоты (ГАМК), проявляющими снотворное, седативное, анксиолитическое и противосудорожное действие. На основании этого механизма действия широкое применение в медицинской практике имеет место использование агонистов бензодиазепиновых рецепторов небензодиазепинового ряда. К небензодиазепиновым анксиолитикам относятся так называемые Z-препараты, по названию первых препаратов из этой группы (зопиклон, золпидем, залеплон). По механизму действия они являются селективными агонистами омега-1-подтипа (зопиклон, золпидем) и омега-2-подтипа (залеплон) бензодиазепиновых рецепторов макромолекулярного ГАМКА-рецепторного комплекса. В настоящее время в России из этой группы препаратов наиболее доступным является залеплон.

Цель исследования – разработка методики обнаружения залеплона и его метаболитов в моче методом ВЭЖХ-МС с ВР с использованием технологии Orbitrap для целей и задач судебно-медицинской экспертизы.

Материал и методы. Утренняя моча отбиралась у пациентов, которые принимали терапевтические концентрации залеплона по назначению врача. Исследовали действующее вещество залеплон в качестве спиртового раствора с содержанием 1 мг/мл исследуемого вещества. Для исследования использовалась ВЭЖХ-МС с высоким разрешением с использованием технологии Orbitrap на приборе. Поскольку при направлении на судебно-медицинскую экспертизу для химико-токсикологического исследования симптоматика побочных эффектов у залеплона схожа с производными бензодиазепина, то пробоподготовку проводили по общепринятой схеме для соединений этой группы.

Результаты. Разработана методика идентификации залеплона в извлечениях из мочи методом ВЭЖХ-МС с ВР с использованием технологии Orbitrap в качестве подтверждающего метода при проведении судебно-химического и химико-токсикологического исследования мочи. Обнаружены и установлены времена удерживания метаболита 5-оксозалеплона после перорального приема и определены характерные ионы для использования при идентификации.

Выводы. Проведенная валидационная оценка разработанной методики свидетельствует о ее пригодности для судебно-химического и химико-токсикологического анализа. Для биологического объекта – мочи относительное стандартное отклонение (RSD,%) при оценке сходимости и внутрилабораторной воспроизводимости времен удерживания не превышала 5%.

Ключевые слова: *залеплон, 5-оксозалеплон, высокоэффективная жидкостная хроматография, судебно-химическое исследование, химико-токсикологический анализ, моча.*

Для цитирования: Волкова А.А., Калёкин Р.А., Орлова А.М., Москалева Н.Е., Маркин П.А., Асташкина О.Г. Химико-токсикологическое исследование залеплона и его метаболитов в биологическом объекте моче. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(4):15–22. https://doi.org/10.29296/25877313-2022-04-03

Производные бензодиазепинов являются психоактивными веществами, модуляторами рецепторов *гамма*-аминомасляной кислоты (ГАМК), проявляющими снотворное, седативное, анксиолитическое и противосудорожное действие. В медицинской практике широко применяются агонисты бензодиазепиновых рецепторов небензодиазепинового ряда. К небензодиазепиновым анксиолитикам относятся так называемые Z-препараты (по названиям первых препаратов из этой группы – зопиклон, золпидем, залеплон). Они являются селективными агонистами омега-1-подтипа (зопиклон, золпидем) и омега-2-подтипа (залеплон) бензодиазепиновых рецепторов макромолекулярного ГАМКА-рецепторного комплекса. В настоящее время в России из этой группы препаратов наиболее доступным является залеплон [1, 2].

Залеплон – снотворное средство пиразолопиримидинового ряда, не относится к производным бензодиазепина, но является агонистом бензодиазепиновых рецепторов. Химическая формула – N-[3-(3-цианопиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ил)-фенил]-N-этилацетамид; молекулярная формула $C_{17}H_{15}N_5O$; торговое название на территории Российской Фудурации «Соната Адамед» и «Анданте». Лекарственная форма – капсулы по 5 и 10 мг [3]. Залеплон является рецептурным лекарственным средством, применяется в качестве снотворного. Для залеплона риск лекарственной зависимости и синдром отмены был и остается достаточно высоким. Отсутствие ряда мер контроля со стороны действующего законодательства за оборотом залеплона предопределяет потенциальную возможность злоупотребления этим препаратом [4].

Поскольку немедицинское применение, комбинация с другими психотропными средствами и алкоголем, а также наличие побочных эффектов могут привести к наступлению острого и летального отравления залеплоном, разработка методики обнаружения и идентификации его современными методами в биологических объектах до настоящего времени остается актуальной задачей судебно-химического и химико-токсикологического исследования [5]. Обнаружение метаболитов залеплона позволяет достоверно утверждать о применении этого вещества потерпевшим и об отсутствии ложноположительного результата при подлоге в виде добавления его в биологический объект. Неинвазивным способом отбора проб и более распространенным является биологическая жидкость – моча [6].

В последние годы наиболее современная с высоким разрешением (ВР) высокоэффективная жидкостная хроматография – масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС) успешно применяется в качестве надежного, селективного и чувствительного метода для скрининга, идентификации и количественной оценки малых молекул [7, 8]. Современное решение актуальных задач для судебно-химических и химико-токсикологических исследований возможно при использовании масс-спектрометра высокого разрешения точной массы с технологией орбитальной ловушки в сопряжении с системой жидкостной хроматографии сверхвысокого давления и генератором азота со встроенным компрессором.

Цель исследования – разработка методики обнаружения залеплона и его метаболитов при использовании методов ВЭЖХ-МС с ВР с использованием технологии Orbitrap для целей и задач судебно-медицинской экспертизы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Мочу отбирали утром у пациентов, которые принимали терапевтические концентрации залеплона по назначению врача. Средний возраст пациентов – 33±6 лет. Забор проб биологической жидкости

производили неинвазивным способом, добровольно с согласия пациентов и на анонимных условиях.

Исследовали действующее вещество залеплон лекарственного препарата «Соната Адамед» (ЛП-004877-040620) после очистки от вспомогательных веществ. Полученный рабочий стандартный образец (РСО) – спиртовой раствор с содержанием 1 мг/мл исследуемого вещества.

Исследование проводили с помощью ВЭЖХ-МС с высоким разрешением с использованием технологии Orbitrap на приборе масс-спектрометр Oritrap Exploris 120 MS (ThermoFisher Scientific, США), который представляет собой автономный прибор Orbitrap™ с источником ионизации при атмосферном давлении (ИАД) для высокопроизводительных задач масс-спектрометрии (МС) с жидкостной хроматографией (ЖХ).

При направлении на судебно-медицинскую экспертизу для химико-токсикологического исследования симптоматика побочных эффектов у залеплона схожа с производными бензодиазепина, поэтому пробоподготовку выполняли по общепринятой схеме для соединений этой группы. Изолирование залеплона проводили после солянокислого гидролиза методом жидкость-жидкостной экстракции: к 5 мл утренней мочи добавляли 5 мл концентрированной соляной кислотой и нагревали в закрытой пробирке на кипящей водяной бане в течение часа (кислотный гидролиз). Далее полученную субстанцию нейтрализовали и подщелачивали 60%-ным гидроксидом натрия (3–6 мл) до pH 10. Экстрагировали дважды хлороформом по 10 мл в делительной воронке при умеренном ручном встряхивании в течение 3 мин. После отстаивания обе фазы (хлороформ) сливали в выпарительную чашку и упаривали досуха на водяной бане, сухой остаток растворяли в 0,5 мл ацетонитрила и отправляли на исследование.

Условия хроматографирования ВЭЖХ-МС ВР: программное обеспечение – Termo Scientific Xcalibur 4.4; колонка TF Accucore PhenylHexyl column (100×2,1 мм, 2,6 мм), температура колонки – 30 °С.

В исследовании использовали разработанную авторами комбинированную подвижную фазу для повышения экспрессности анализа, уменьшения ширины хроматографических пиков с учетом разного градиента по составу подвижной фазы, а также изменение скорости подачи фазы. Подвижная фаза представлена в градиентном режиме: подвижная фаза А – 2 мМ раствора аммония формиата в водном растворе 0,1%-ной муравьиной кислоты (pH 3,0); подвижная фаза В – 2 мМ раствора аммония формиата в растворе 0,1%-ной муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил–метанол (1:1). Скорость потока – 0,5 мл/мин. Градиентный режим представлен в табл. 1.

Таблица 1. ***Градиент подвижной фазы***

Время, мин	Скорость потока подвижной фазы, мл/мин	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза В, %
0	0,5	99,0	1,0
1,0	0,5	99,0	1,0
10,0	0,5	1,0	99,0
11,5	0,5	1,0	99,0
12,0	0,5	99,0	1,0
13,5	0,5	99,0	1,0

Детектирование проводили в режиме информационно зависимой фрагментации. Режим полного сканирования с обнаружением ddMS2: диапазон сканирования 100–1000 m/z; RF Lens 50% сбора данных с высоким разрешением Orbitrap 120000 FWHM. Режим диапазона сканирования автоматический; автоопределение времени инжекции ионов в ловушку. Порог интенсивности для фрагментации – 2000. Обнаружение вершины – 30%, изолирующее окно – 1 m/z, режим энергии столкновения – ступенчатый, тип энергии столкновения – абсолютный. Энергия диссоциации (HCD) – 15, 30, 45%. Разрешение для фрагментов – 30000. Для оптимизации условий качественного и количественного анализа уточнение окон обнаружения выполняли рутинным для лаборатории методом.

Режим исключения ионов осуществляли после получения одного спектра за 3 с. Применение подобранного режима сканирования позволило получить максимальную чувствительность (ввиду отсутствия потерь в процессе соударительной ионизации), что необходимо при оценке временных окон обнаружения, так как при оптимизации метода на быстрое разделение исследуемого вещества и соэкстрактивных веществ могло привести к возникновению ложноотрицательных результатов из-за низкой скорости сканирования, в то время как её существенное повышение могло привести к значительному падению интенсивности сигналов, что очень важно при определении метаболитов при низких (терапевтических) концентрациях в биологических жидкостях (моче).

В работе использовали систему, которая была оснащена источником ионизации со следующими параметрами: тип ионного источника H-ESI; напряжение электроспрея – положительная ионизация 3500 V, отрицательная ионизация 2500 V. Распыляющий газ – азот 50 отн. ед., вспомогательный газ – азот 13 отн. ед. Температура капилляра – 280 ºС; температура испарителя – 350 ºС. Встроенная подстройка массы – EASY-IC™ (флуорантрен).

Идентификацию нативного соединения залеплона и его метаболитов после хроматографирования проводили при использовании библиотек масс-спектрометрической информации:

TRACEFINDER 5.1 SP1; TOXFINDER 1.0;

EFS_HRAM_Compound_Database;

Toxicology_HRAM_Compound_Database;

Thermo Scientific™ mzVault HRAM MS/MS spectral library;

COMPOUND DISCOVERER 3.1; MzCloud.

Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью программы Windows Excel 2010 и с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при доверительной вероятности $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подобранные условия хроматографирования – комбинированный градиент подвижной фазы и температурный режим позволили уменьшить количество коэлюирующихся соединений из мочи и обеспечили получение качественных результатов, представленных на рис. 1 и 3.

На представленной хроматограмме идентифицирован залеплон и его метаболит 5-оксозалеплон. Идентификацию проводили по временам удерживания и после анализа характерных ионов масс-спектров данных соединений. Время удерживания нативного залеплона составило 6,09 мин, а у 5-оксозалеплона – 5,47 мин.

При идентификации, кроме времени удерживания, значимым фактором являются спектральные характеристики исследуемых веществ, которые представлены на рис. 2 и 4.

Полученные полные спектры исследованных веществ с диссоциацией масс-спектров ионов характерных фрагментам молекулы в различных функциональных группах позволяют выделить по 8 характерных ионов, m/z: залеплон – 143, 155, 182, 209, 219, 236, 264, **306;** 5-Оксозалеплон – 118, 144, 180, 207, 235, 252, **276**, 294.

Согласно приведенным данным, можно выделить для каждого исследуемого соединения характерный ион, однако идентификацию необходимо проводить не менее чем по пяти ионам. При исследовании возможно выполнение анализа в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) по заданным ионам. Для метаболита залеплона и 5-оксозалеплона наиболее интенсивным в масс-спектрах является ион с m/z 144 (оксопроизводное пиримидина).

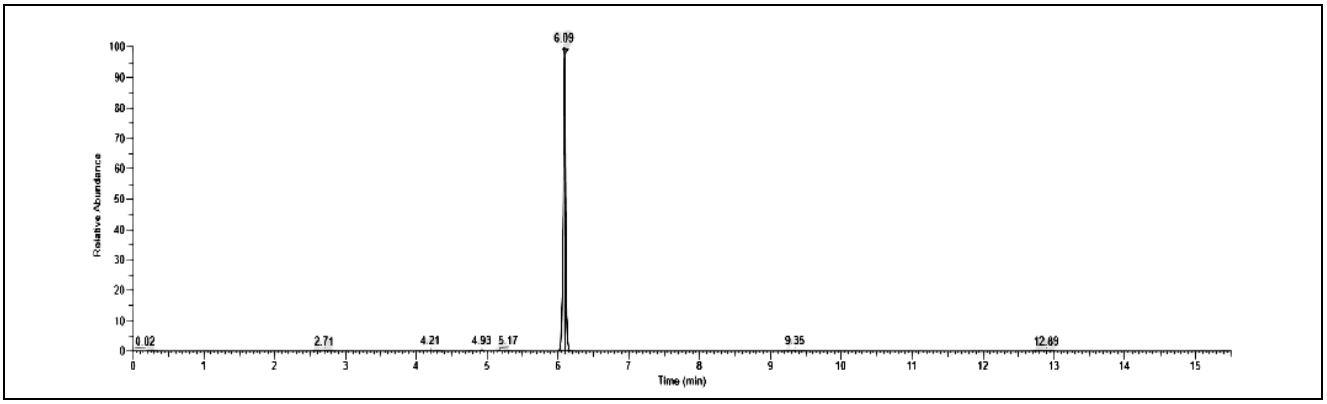

Рис. 1. Хроматограмма мочи с идентифицированным залеплоном

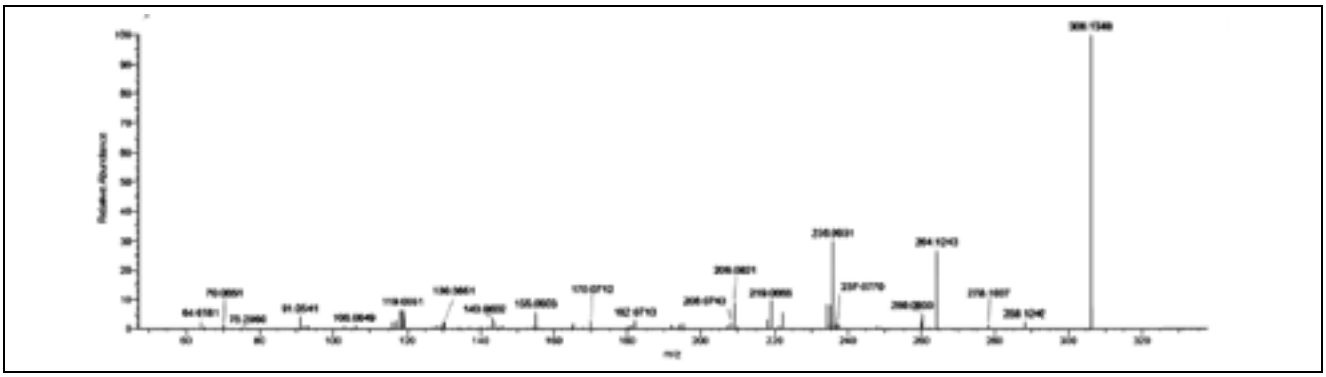

Рис. 2. Масс-спектр залеплона

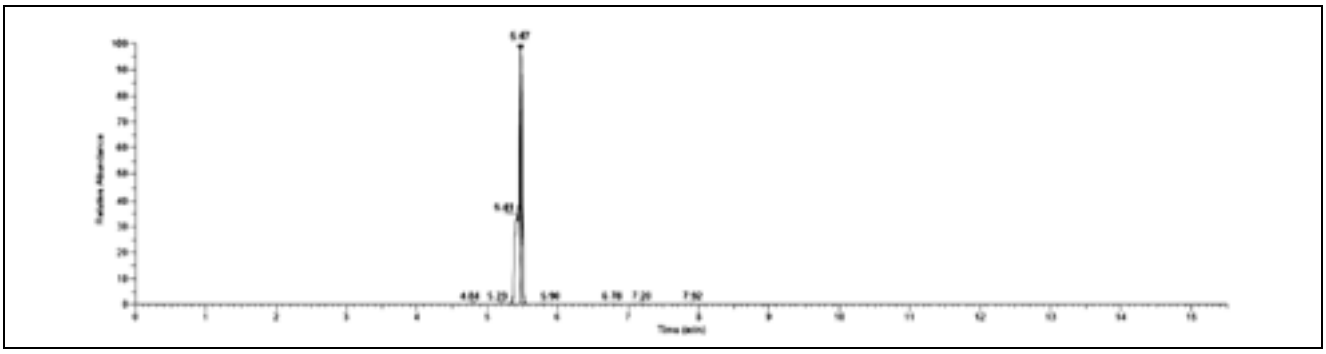

Рис. 3. Хроматограмма мочи с идентифицированным 5-оксозалеплоном

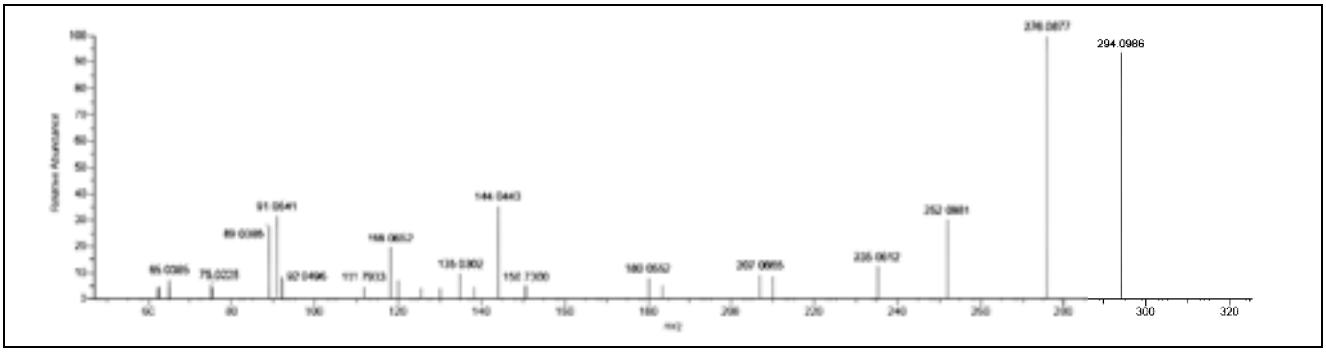

Рис. 4. Масс-спектр 5-оксозалеплона

Таблица 2. ***Оценка параметров валидационных характеристик при идентификации залеплона и его метаболита***

Параметр	Результат
Оценка переноса аналита	Перенос аналита для 10 нг/мл не наблюдается
Определение интерференционных эффектов	Интерференционные эффекты внутри группы лекарственных препаратов – метаболиты других агонистов бензодиазепиновых рецепторов (клобазам, зопиклон, феназепам) не наблюдаются
Подавление/повышение ионизации	от –4,9 до 2,2%; RSD < 14%

Следует отметить, что ионы, находящиеся в «неинформативном» диапазоне (менее 150 а.е.м.), присутствуют в обоих изучаемых соединениях, поэтому на результаты идентификации сильно влияют компоненты матрицы исследуемого образца и «фона» хроматографической колонки. Следовательно, рекомендовано оптимально использовать для идентификации данные более 150 а.е.м.

По совокупности параметров – наличия залеплона и метаболита, наличия пиков с точно таким же спектром, а также одинакового времени удерживания, можно достоверно утверждать присутствие данного соединения в биологическом объекте.

По результатам исследования разработанной методики провели статистическую обработку полученных данных и валидационную оценку по следующим параметрам: оценка переноса аналита, определение интерференционных эффектов, подавление/повышение ионизации [9]. Полученные данные сведены в табл. 2, из которой видно, что параметры валидационных характеристик соответствуют критериям приемлемости.

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика идентификации залеплона в извлечениях из мочи методом ВЭЖХ-МС с ВР с использованием технологии Orbitrap в качестве подтверждающего метода при проведении судебно-химического и химико-токсикологического исследования мочи.

2. Обнаружены и установлены времена удерживания метаболита 5-оксозалеплона после перорального приема и определены характерные ионы для использования при идентификации.

3. Проведена валидационная оценка разработанной методики по параметрам: «оценка переноса аналита», «определение интерференционных эффектов», «подавление/повышение ионизации», которая свидетельствует о пригодности предложенной методики для судебно-химического и химико-токсикологического анализа при идентификации метаболитов залеплона в биологическом объекте – моче.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Маркин П.А., Москалева Н.Е., Апполонова С.А., Волкова А.А., Орлова А.М., Калёкин Р.А., Невмятова С.Р.* Разработка метода тонкослойной хроматографии для одновременного определения клобазама и залеплона в смеси. В сборнике: Актуальные вопросы судебной медицины и права. Сб. науч.-практич. статей. Казань. 2021: 158–161.
2. *Орлова А.М., Калёкин Р.А., Волкова А.А., Невмятова С.Р., Полушкина Н.В.* Обнаружение клобазама в моче методом тонкослойной хроматографии. Вестник ВГУ, серия: химия, биология, фармация. 2021; 3: 106–113.
3. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Соната®Адамед ЛП-004877-040620. https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=c37e6cb0-56f7-4171-a3b9-ebabfafed653&t=доступ 03.06.2021.
4. *Порсева Н.Ю., Дворская О.Н.* Правовые аспекты оборота снотворных препаратов, способных вызывать лекарственную зависимость. Современные проблемы науки и образования. 2015; 3: 242. URL: http://science-education.ru/ru/article/view?id=20191 (дата обращения: 03.06.2021).
5. *Павлова А.З., Калёкин Р.А., Орлова А.М., Ларев З.В.* Возможности лабораторной диагностики отравлений для судебно-медицинских и клинических целей. В сборнике: Трезвость как социальный фактор развития общества. Сб. статей Всеросс. науч.-практич. конф. Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова. 2018: 168–175.
6. *Калёкин Р.А., Павлова А.З., Орлова А.М., Булыгина И.Е.* К вопросу установления факта отравления психотропными и сильнодействующими веществами в биологических объектах не инвазивного отбора. Актуальные вопросы судебной медицины и общей патологии. Матер. научн. практ. конф. Декабрьские чтения в РУДН (21 декабря, 2018). М. 2019: 80–84.
7. *Helfer A.G., Michely J.A, Weber A.A, Meyer M.R., Maurer H.H.* Liquid chromatography-high resolution-tandem mass spectrometry using Orbitrap technology for comprehensive screening to detect drugs and their metabolites in blood plasma. Analytica Chimica Acta. 2017; 965: 83–95. doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.002.
8. *Helfer A.G., Michely J.A., Weber A.A., Meyer M.R., Maurer H.H.* Orbitrap technology for comprehensive metabolite-based liquid chromatographic-high resolution-tandem mass spectrometric urine drug screening – exemplified for cardiovascular drugs. *Analytica Chimica Acta*. 2015; 891: 221–233.
9. *Барсегян С.С., Саломатин Е.М., Плетенева Т.В., Максимова Т.В., Долинкин А.О.* Методические рекомендации по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала. Методические рекомендации. Под ред. *Р.А. Калёкина* Москва: РЦСМЭ; 2014.

Поступила после доработки 8 марта 2022 года