



УДК 543.544:543.645.9

Определение кветиапина, его производных и метаболитов методами газожидкостной хромато-масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии в биологических образцах

Мельник А.А., Григорьев А.М., Азарова Л.В.

*Областное государственное учреждение здравоохранения особого типа
«Бюро судебно-медицинской экспертизы», судебно-химическое отделение, Белгород.*

Поступила в редакцию 9.11.2009 г.

Аннотация

Рассмотрены преимущества и ограничения применения методов ГЖХ-МС и ВЭЖХ-ДМД при определении метаболитов и производных кветиапина в биологических жидкостях. Приведена оценка степени термолитиза дибензотиазепиновых производных в условиях ГЖХ. Определены ГЖХ-МС-характеристики идентифицированных метаболитов и производных кветиапина на двух фазах разной полярности. Представленные варианты количественного определения кветиапина методом ГЖХ-МС (в виде ацетата) и ВЭЖХ-ДМД в биологических жидкостях основаны на подготовке проб методами жидкостно-жидкостной и твердофазной экстракции.

Ключевые слова: кветиапин, метаболиты, газожидкостная хроматография, масс-спектрометрическое детектирование, высокоэффективная жидкостная хроматография

Advantages and restrictions of GLC-MS and HPLC-DAD methods are considered at determination of metabolites and derivatives of quetiapine in biological liquids. The estimation of thermolysis degree of dibenzotiazepine derivatives in GLC conditions is presented. GLC-MS properties of the identified quetiapine metabolites and derivatives on two phases of different polarity are determined. The presented variants of quantitative determination quetiapine by GLC-MS (as acetylated form) and HPLC-DAD methods in biological liquids are based in liquid-liquid and solid-liquid extraction.

Key words: quetiapine, metabolites, gas-liquid chromatography, mass-spectrometric detection, high-performance liquid chromatography

Введение

Кветиапин (quetiapine, сероквель, seroquel, 2-[2-(4-добензо[b,f][1,4]тиазепин-11-ил-1-пиперазинил)этокси]-этанол) – атипичный нейрорептик, сравнительно новое антипсихотическое средство, применяемое для лечения острых антипсихотических состояний, и, в частности – для лечения шизофрении [1].

Методы высокоэффективной тонкослойной хроматографии [2] вполне применимы для быстрого определения кветиапина в простых фармацевтических смесях и субстанциях. Тем не менее, основным способом определения кветиапина (как в фармацевтических формах, так и в биообъектах) является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Как правило, это обращенно-фазовый режим с

детектированием в ультрафиолетовой области [3-5] или с применением масс-селективных детекторов (МСД) [6,7], предложено также использование монокристаллической колонки [8]. К сожалению, масс-селективные ВЭЖХ-детекторы пока дороги как в изготовлении, так и в эксплуатации.

С точки зрения хроматографа, специализирующегося в газожидкостном варианте (ГЖХ), кветиапин является достаточно неудобным объектом для определения. Сравнительно высокая масса (383), наличие трех атомов азота и алифатической гидроксильной группы приводит к тому, что кветиапин обладает значительным удерживанием и дает широкие несимметричные пики в условиях обычного обзорного газожидкостного режима на типовых (неукороченных) скрининговых капиллярных колонках. Кроме того, есть основания предполагать возможный термолитиз производных кветиапина [11] в условиях ГЖХ.

С точки зрения химика-токсиколога (или судебного химика) кветиапин неудобен из-за его быстрой и почти полной метаболизации (содержание неметаболизированного кветиапина в моче менее 1%, [9]) и довольно широким спектром метаболитов [10]. Как известно, в области ВЭЖХ до сих пор отсутствует общепринятая шкала относительного удерживания (подобно системе индексов Ковача в ГЖХ). Несмотря на то, что большинство исследователей все же сосредоточились на определении метаболитов кветиапина [5, 7-10], следует признать, что надежность идентификации и следовательно, принятие положительного заключения о факте использования кветиапина возможно лишь на основе знания удерживания и спектральных характеристик как можно большего числа производных и метаболитов, содержание и вид которых меняется в зависимости от способа пробоподготовки.

Важным недостатком всех перечисленных аналитических работ мы считаем отсутствие единого и надежного метода, позволяющего доказывать факт использования кветиапина как на основе наличия исходного соединения, так и его метаболитов в биологических образцах. Считая несомненной пользу частных методик определения любого соединения, нельзя не признать, что современная фармакология диктует жесткие требования к обзорным методам, позволяющим одновременно регистрировать наличие как можно большего числа соединений. Поэтому сведение частных методик к общим (обзорным) является важнейшей задачей судебной химии и аналитической токсикологии.

В данном исследовании мы идентифицировали ряд производных, дериватов и метаболитов кветиапина и определили характеристики их удерживания на двух широко распространенных фазах разной полярности. Предлагаемый ГЖХ-МС метод количественного определения исходного кветиапина в виде ацетата основан на обзорном режиме и пригоден также для определения метаболитов в биологических образцах. В качестве дополнительного варианта количественного определения предлагается метод ВЭЖХ с УФ-детектированием. Подготовка проб пригодна для определения кветиапина и его метаболитов в биологических жидкостях и извлечениях из тканей.

Эксперимент

Основным аналитическим инструментом, используемый в данной работе является газовый хроматограф 6890 с масс-спектрометрическим квадрупольным детектором 5975VL (Agilent Technologies) настроенным на возбуждение электронным ударом (70 эВ). В режиме сканирования (SCAN) диапазон

регистрируемых ионов составлял 50-550 m/z, также применяли режим регистрации групп ионов (SIM). Температуры инжектора и устройства сопряжения хроматографа с детектором составляли 270 и 290°C соответственно, инжектор настраивали на ввод пробы без сброса (splitless). Хроматограммы получали с применением двух кварцевых капиллярных колонок разной полярности. Для каждой колонки применяли два температурных режима: «быстрый» обзорный (1) и «медленный» для регистрации плохо разделенных зон (2). Начальные стадии температурных программ одинаковы для всех режимов обеих колонок: начальная температура 50°C (0.5 мин), подъем со скоростью 99°C/мин (до 100°C, выдержка 1 мин) и далее не указаны.

Колонку EVDX-5ms (слабополярная, 5% фенилметилсилоксан) длиной 25 м, внутренним диаметром 200 мкм и толщиной фазы 33 мкм применяли в условиях:

- режим 1 – подъем со скоростью 35°C/мин (300°C, 15 мин);
- режим 2 – подъем со скоростью 15°C/мин (280°C, 25 мин).

Колонку DB-17ms (среднеполярная, 50% фенилметилсилоксан) длиной 15 м, внутренним диаметром 250 мкм, толщиной фазы 25 мкм применяли в условиях:

- режим 1 – подъем со скоростью 20°C/мин (300°C, 10 мин);
- режим 2 – подъем со скоростью 9°C/мин (280°C, 20 мин).

Скорость газа-носителя (гелия) постоянная, 0.8 и 1 мл/мин соответственно для первой и второй колонок, объем вводимой пробы 0.2 мкл.

Для обработки масс-хроматограмм использовали систему AMDIS (NIST).

Жидкостнохроматографические измерения выполняли на модульной системе 1200 (Agilent Technologies) с бинарным насосом G1312A и диодно-матричным детектором (ДМД) G1315B. Колонку Диасфер 110-C18 с размерами 250 мм * 4 мм, 6 мкм (БиоХимМак) с форколонкой (4.6 мм * 12.5 мм), термостатировали при 25°C, скорость потока элюента 1 мл/мин. Детектирование при 206 и 285 нм, запись спектра 200–400 нм. Объем вводимой пробы 5–40 мкл.

Градиентное элюирование выполняли смесью водного раствора хлорной кислоты (20 мМ) и ацетонитрила (от 20 до 50 об.% ацетонитрила за 15 мин) по линейному закону.

Ацетилирование проводили по стандартной методике в смеси, содержащей по 50 мкл уксусного ангидрида и пиридина в течение 20 мин при 70°C, после чего упаривали летучие продукты в вакууме при 40°C. Сухие продукты растворяли в подходящем растворителе (этанол для ГЖХ и начальный элюент для ВЭЖХ).

Силилирование также проводили по стандартной методике в смеси по 50 мкл BSTFA + 1% TMCS и этилацетата в течение 30 мин при 60°C, смесь после силилирования вводили в газовый хроматограф.

Все использованные реактивы марки «хч» или «чда». Ацетонитрил «Panreac», «gradient grade».

Обсуждение результатов

ГЖХ-МС. Перед тем, как рассмотреть аспекты хроматографического поведения производных кветиапина, следует выделить две основные задачи, решаемые аналитиками: выяснение факта применения некоего соединения и его количественное определение. Метод ГЖХ-МС, безусловно, пригоден для решения первой. Кветиапин (IX) почти полностью метаболизируется с образованием по крайней мере, 20 соединений [13]. Определение части из них (продукты сульфокисления и гидроксирования исходной структуры) может быть крайне

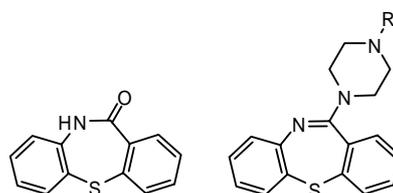
затруднено из-за значительного удерживания, хотя возможно, осуществимо на коротких тонкофазных колонках.

Индексы Ковача и масс-спектры ряда производных и метаболитов кветиапина приведены в известной токсикологической обзорной базе MPW2007 [11]. Но эти индексы измерены на неполярной фазе и обычно не могут быть применены непосредственно, поскольку наиболее распространенной фазой для определения соединений, имеющих токсикологическое, наркологическое и судебно-медицинское значение в настоящее время является слабополярная фаза. Индексы удерживания для слабополярной фазы могут быть рассчитаны приблизительно по неполярным индексам [12]. Тем не менее, уточненные значения предпочтительны. Мы идентифицировали и определили удерживание ряда метаболитов и производных кветиапина на двух распространенных фазах (эквивалентных 5% и 50% фенилметилполисилоксан) для двух разных температурных программ (табл. 1).

Таблица 1. Индексы Ковача, молекулярные массы и характеристичные ионы производных и метаболитов кветиапина

Соединение	EVDX-5ms		DB-17ms		[M ⁺]	Характеристичные <i>m/z</i>
	1	2	1	2		
I	2354	2316	2911	2883	227	167, 195, 209, 227
II	2744	2700	3392	3324	295	210, 227, 239, 265
III	3070	3035	3796	3727	339	100, 210, 239, 251
IV	3110	3066	3925	3852	323	210, 239, 251, 323
V	3095	3064	–	–	411	172, 210, 239, 321
VI	3136	3098	3833	3775	367	210, 239, 338, 367
VII	3172	3126	3964	3898	337	210, 239, 251, 337
VIII	3173	3134	3879	3823	381	210, 239, 251, 321
IX	3347	3310	4120	4053	383	144, 210, 239, 321
X	3389	3356	–	–	455	210, 239, 279, 322
XI	3461	3427	4231	4175	425	186, 210, 239, 321

Все перечисленные соединения найдены в исследуемых биологических образцах, прошедших разную обработку или в таблетках «Сероквель» (АстраЗенека). Их структуры таковы (Ac – ацетильное производное, TMS – триметилсилильное):



I II - XI

где R = – H (II), – (CH₂)₂–OH (III), – CHO (IV), – (CH₂)₂–O–TMS (V), – (CH₂)₂–O–C₂H₅ (VI), – Ac (VII), – (CH₂)₂–O–Ac (VIII), – (CH₂)₂–O–(CH₂)₂–OH (IX, кветиапин), – (CH₂)₂–O–(CH₂)₂–O–TMS (X), – (CH₂)₂–O–(CH₂)₂–O–Ac (XI).

Масс-спектры всех соединений характеризуются хорошо заметными молекулярными ионами, а также (кроме I) интенсивными сигналами с *m/z* 210 (C₁₃H₈NS⁺) и 239 (C₁₄H₁₁N₂S⁺). Дибензотиазепинон (I) и этилат (VI) найдены как в таблетках, так и в биообразцах. Соединения II – IV являются метаболитами кветиапина (IX) по боковой цепи, VII, VIII и XI – продукты ацетилирования II, III и

IX соответственно, V и X – триметилсилильные производные III и кветиапина. Согласно нашим измерениям, в смеси метаболитов (наблюдаемых данным методом) преобладает соединение II. К сожалению, несмотря на легкость образования всех перечисленных дериватов, мы не смогли получить его триметилсилильное производное.

Вторая задача – количественное определение данным методом – может быть поставлена под сомнение. Рассмотрение процессов хроматографирования и масс-спектров окрестностей хроматографических зон производных кветиапина привело к подтверждению довода [11] о нетермостабильности подобных соединений. На это указывает, в первую очередь, несовпадение селективных масс-хроматограмм.

На рис. 1 приведены одинаковые участки (длительность 2 мин), окрестностей хроматографических зон кветиапина, его ацетильного и триметилсилильного производного (колонка EVDX-5ms). Выбраны ионы m/z 210 (соответствующий производным кветиапина) и 207 ($C_{14}H_{11}N_2^+$, продукты термоллиза).

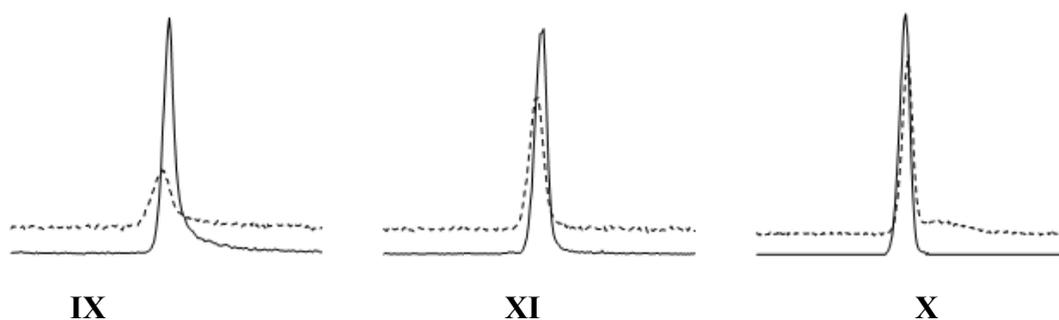


Рис. 1. Фрагменты (2 мин) селективных масс-хроматограмм кветиапина и его дериватов (колонка EVDX-5ms). Ионы m/z 207 (---), 210 (—)

Присутствие посторонних соединений на хроматограммах смесей, содержащих производные кветиапина отмечено в библиотеке MPW2007 [11] как «artifact desulfo». Брутто-формулы этих соединений отличаются от исходных отсутствием атома серы, а их масс-спектры указывают на наличие фенантридинового фрагмента в их структурах. Ответить на важный вопрос о том, образуются ли эти соединения в колонке (инжекторе) хроматографа, или попадают туда как элементы смесей извне можно, изменив селективность разделения (рис. 2, колонка DB-17ms).

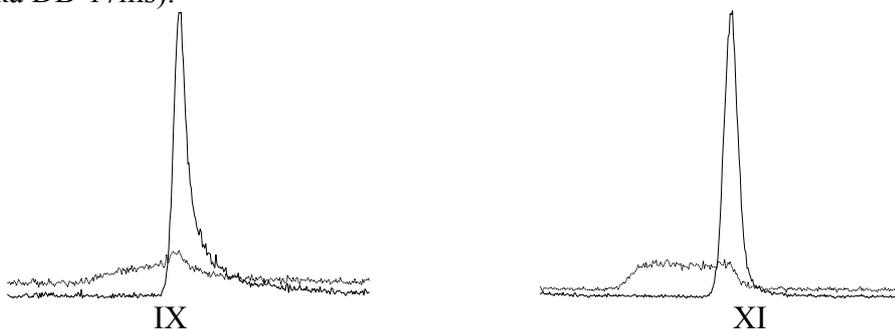
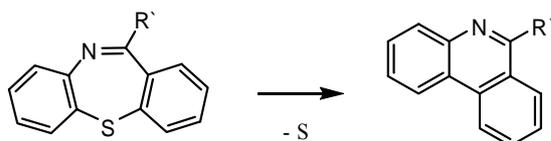


Рис. 2. Фрагменты (2 мин) селективных масс-хроматограмм кветиапина и его ацетата (колонка DB-17ms). Обозначения те же, что и на рис. 1

Снижение относительного удерживания десульфированных производных приводит к характерной картине термодеструкции. В таком случае, можно предположить, что при высокой температуре (и в отсутствие воздуха) происходит реакция:



В пользу такого предположения говорит также характер зависимости отношения площади пика, образованного ионом m/z 207 к сумме площадей пиков с m/z 207 и 210 (доля m/z 207) от времени пребывания в колонке, рис. 3. Приведена зависимость для ацетата кветиапина, температура колонки 300°C .

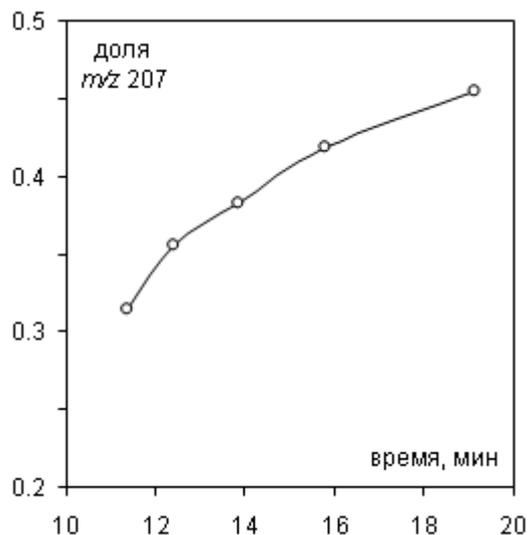


Рис. 3. Доля площади пика, образованного ионом m/z 207 от суммы площадей пиков m/z 207 и 210 для кветиапина ацетата.
Абсцисса – время пребывания смеси в колонке (300°C)

Близкое удерживание производных кветиапина и их десульфированных продуктов (рис. 1, слабополярная фаза) может быть объяснено противоположными изменениями энтропийного и энтальпийного факторов. Дибензотиазепиновая структура неплоская (в этом можно убедиться с помощью программ молекулярного моделирования, например, HyperChem). Угол между плоскостями бензольных колец примерно равен 120° (полуэмпирический метод AM1). Но фенантридиновая структура плоская. Поскольку в хроматографии энтальпийный и энтропийный факторы оказывают противоположное действие на коэффициент распределения, то можно предположить, что падение энтальпии распределения, при переходе от дибензотиазепина к фенантридину, почти компенсируется уменьшением энтропии, обусловленному большей упорядоченностью фенантридиновой структуры.

К сожалению, в отсутствие возможности калибровки по фенантридиновым производным можно привести только оценочное значение степени распада. Если предположить, что сечения захвата электронов и средняя скорость движения в вакууме близки для дибензотиазепиновых и фенантридиновых производных (а массовый процент серы в молекуле кветиапина ацетата $\sim 7.5\%$), то при малом отличии во временах удерживания калибровочные коэффициенты по общему ионному току МСД также близки. Следовательно, различие в чувствительности в режиме SIM будет определяться только долей интенсивности регистрируемых m/z в спектрах производных кветиапина и их десульфированных продуктов. Фрагменты масс-спектров кветиапина ацетата и его десульфированного производного в области наиболее интенсивных ионов приведены на рис. 4.

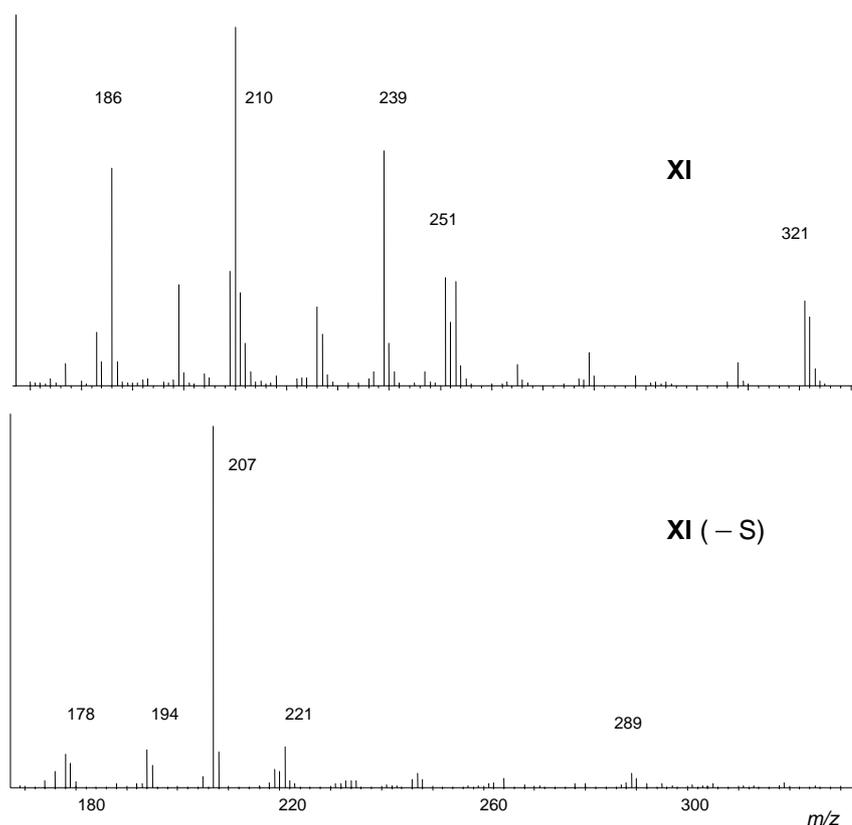


Рис. 4. Фрагменты масс-спектров кветиапина ацетата и его дисульфированного производного. Область наиболее интенсивных ионов, диапазон m/z 170-330

Доля иона с m/z 210 в спектре кветиапина ацетата примерно равна 11%, а доля иона с m/z 207 в спектре его дисульфированного производного – около 25%. Следовательно (учитывая сделанные предположения) при регистрации данных ионов чувствительность по ацетату кветиапина будет примерно в 2.3 раза ниже. Поскольку для колонки EVDX-5ms и температурного режима 1 время удерживания кветиапина ацетата около 21 мин, то длительность его пребывания при 300°C примерно равна 14 мин, а доля дисульфированного продукта к моменту выхода из колонки составит около 17% (рис. 3).

Рассмотренный процесс заметен по крайней мере, для соединений V – XI (обладающих наибольшим удерживанием). Можно с уверенностью предположить, что использование более тонкофазных колонок (например, стандартной HP-5ms с размерами 30 м * 250 мкм * 0.25 мкм) позволит снизить степень термоллиза.

Допустимость количественных определений может быть обусловлена воспроизводимостью самого процесса термоллиза (и времен удерживания), а также приемлемостью метрологических характеристик. В этом случае термоллиз будет проявляться только как снижение чувствительности определения.

Ацетилирование и количественные аспекты (ГЖХ-МС). Как можно убедиться (рис. 1 и 2), для определения кветиапина (как и его метаболитов) желательно использовать дериватизацию. Хотя авторы [10] применяли триметилсилильное производное (X), следует учесть нестабильность подобных соединений. Можно также отметить, что удерживание ацетата (XI) больше, чем удерживание X всего на 72 ед. индекса, и эта разница не является принципиальной.

Полноту и воспроизводимость процесса ацетилирования проверяли методом ВЭЖХ. Для этого выбраны 2 раствора кветиапина с концентрациями 3.3 и 170 мкг/мл. Пять порций каждого раствора ацетилировали согласно описанной выше методике и определяли площади пиков получающегося кветиапина ацетата. Ни в одном случае не был найден непрореагировавший кветиапин. Относительные среднеквадратичные отклонения площадей пиков кветиапина ацетата (включающие погрешности разведения и хроматографирования) составили 2.8% и 1.6% для малой и большой концентраций соответственно.

Калибровочную зависимость по кветиапину ацетату определяли методом внутреннего стандарта (гексадецил додеcanoат) по площадям пиков. При использовании режима SIM (m/z 210, 239, 251, 321) в диапазоне 5 – 170 мкг/мл кветиапина данная зависимость хорошо аппроксимируется полиномом второго порядка (квадрат коэффициента корреляции 0.998). Для определения отклика внутреннего стандарта измеряли площади иона m/z 201, выделенного из общего ионного тока. При введении в группу SIM для кветиапина ацетата иона m/z 207 (продукт десульфирования кветиапина ацетата) относительные площади растут в 1.16 раз, т.е. калибровочная зависимость меняется по линейному закону без свободного члена. Однако, применение подобного режима (сумматное определение кветиапина ацетата и его дисульфированного продукта) не может быть рекомендовано вследствие того, что m/z 207 – основной фоновый ион для фаз, подобных 5% фенилметилсилоксан.

Относительное среднеквадратичное отклонение относительных площадей кветиапина ацетата составило 3.9% (для 11 измерений), порог обнаружения 0.94 мкг/мл. При увеличении объема вводимой пробы (0.2 мкл) до 1 мкл порог обнаружения может быть снижен без существенных ухудшений хроматографического поведения сильноудерживаемых компонентов.

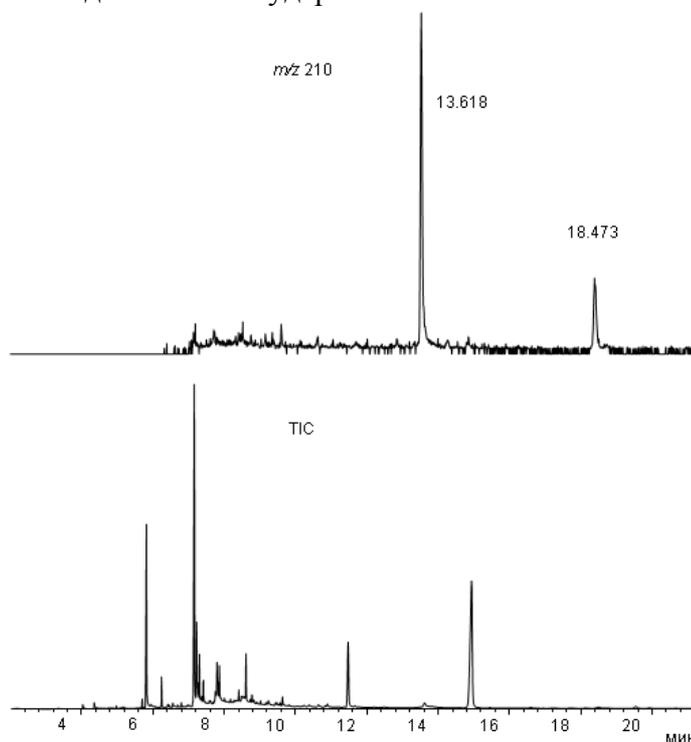


Рис. 5. ГЖХ-масс-хроматограммы ацетилированного образца мочи (ион m/z 210 и общий ионный ток, колонка EVDX-5ms). Сигнал со временем удерживания 13.618 мин соответствует соединению VII, 18.473 – кветиапину ацетату

На рис. 5 приведены масс-хроматограммы ацетилированного образца мочи при детектировании по общему ионному току и по иону m/z 210. Колонка EVDX-5ms, температурный режим 1.

Мы полагаем, что представленные данные свидетельствуют о допустимости количественного определения кветиапина даже при имеющемся времени удерживания (а значит – и степени термоллиза). Переход на короткие (10–15 м) и тонкофазные (~ 0.1 мкм) колонки не является необходимостью особенно при учете длительности этой процедуры для МСД.

ВЭЖХ. Выбор сильноокислого элюента обусловлен необходимостью хроматографирования кветиапина и его производных в виде двузарядных катионных форм (см. далее). Применение хлорной кислоты в качестве добавки, регулирующей удерживание ионогенных соединений, позволяет повысить нагрузочную способность системы для них.

Несмотря на очевидные преимущества метода ВЭЖХ (малая вероятность протекания реакций с участием определяемых соединений, высокая линейность калибровочных зависимостей и пр.), определение производных кветиапина этим методом и при использовании ДМД имеет три существенных недостатка. Первое: УФ-спектры производных кветиапина малохарактеристичны, что повышает вероятность ложных определений, когда их концентрации малы и (или) образец плохо очищен. Второе: низкая (по сравнению с ГЖХ) фактическая эффективность колонок, что наиболее отчетливо проявляется для ионогенных соединений. Третье (характерное для детектирования полосовых спектров): затруднения в интегрировании плохо разделенных хроматографических зон; следует учесть, что из-за сложности биообразцов индивидуальных пиков на ВЭЖХ-ДМД-хроматограммах не бывает вообще. Почти полная метаболизация кветиапина, что может наблюдаться при его употреблении в терапевтических концентрациях, приводит к невозможности надежной идентификации.

Тем не менее, метод ВЭЖХ пригоден для определения кветиапина по крайней мере, при уверенности в его присутствии в образце. Для предложенных условий калибровочная зависимость практически линейна по крайней мере, в диапазоне 0.4 – 170 мкг/мл (абсолютная калибровка по площадям пиков, длина волны детектирования 206 нм). Относительное среднеквадратичное отклонение 0.7% (для пяти измерений), порог обнаружения для водных растворов кветиапина составляет 20 нг/мл.

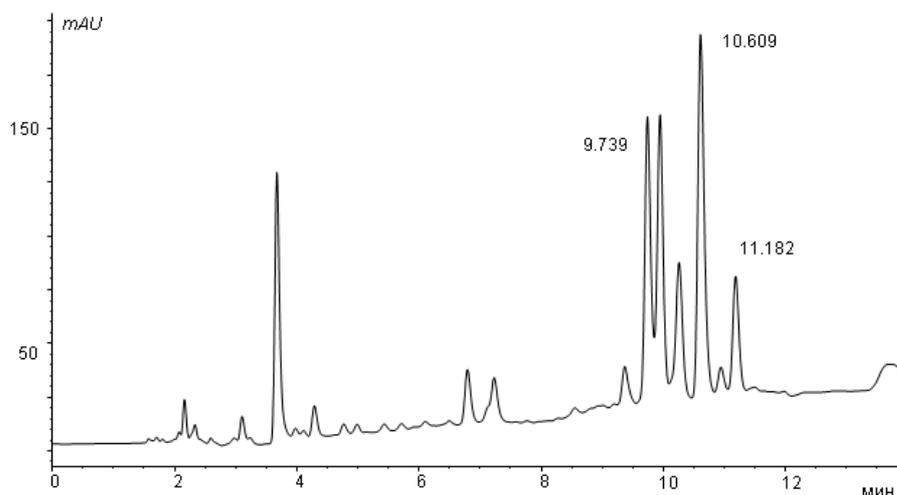


Рис. 6. ВЭЖХ-хроматограмма кветиапина (10.609 мин) и его метаболитов, выделенных из мочи

На рис. 6 приведена хроматограмма смеси кветиапина и его метаболитов, выделенных из мочи методом твердофазной экстракции (ТФЭ). Пик со временем удерживания 10.609 принадлежит кветиапину. Группа пиков в области 9.74 мин и 11.18 мин имеют УФ-спектры, подобные спектру кветиапина и, по-видимому, принадлежат к его метаболитам.

Данный образец содержит существенное количество неметаболизированного кветиапина и может быть использован для количественных определений методом ВЭЖХ.

Подготовка проб. Мы рассмотрели как возможность жидкостно-жидкостной, так и твердофазной экстракции. В сильноокислых водных растворах кветиапин существует в виде двузарядного катиона (pK_{A1} и pK_{A2} равны 3.3 и 6.8 соответственно [13]). Поскольку экстрагируемость определяется также гидрофобностью соединения, мы измерили концентрации кветиапина в водной фазе после однократной экстракции хлороформом. Величину pH водной фазы регулировали фосфатным буфером, образованным 0.2 М раствором ортофосфорной кислоты с добавками гидроксида натрия. Соотношение фаз всегда было равно 1:1. Зависимость содержания кветиапина в водной фазе от ее pH после экстракции определяли методом ВЭЖХ (рис. 7).

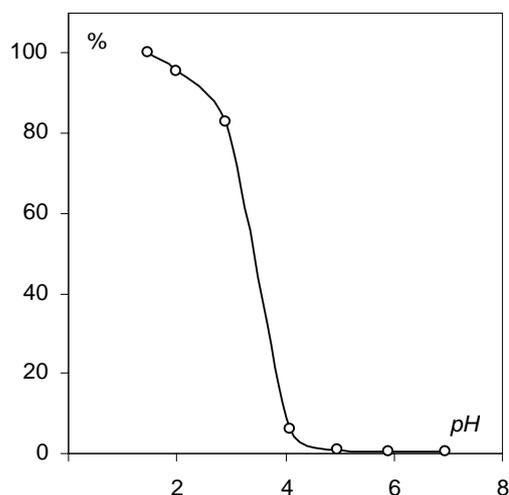


Рис. 7. Изменение концентрации кветиапина (% от исходной) в водной фазе после экстракции в хлороформ

Полученная зависимость соответствует первой константе (pK_{A1}). Кветиапин экстрагируется в хлороформ при его однозарядной и нейтральной формах в водном растворе. Такая зависимость позволяет проводить очистку биообразцов, содержащих кветиапин способом экстракции части матрицы образца из кислого ($pH < 2$) водного раствора; при этом потери целевого соединения при однократной экстракции и соотношении фаз 1:1 составят менее 5%.

Твердофазную экстракцию выполняли на патронах AccuBond^{II} SPE EVIDEX, 200 мг * 3 мл (Agilent Technologies), заполненных смешанным (обращенно-фазовым и сильным катионообменным) сорбентом. Принцип подбора условий основан на сорбировании кветиапина (и его метаболитов) по катионообменному механизму в однозарядной форме, что позволяет снизить содержание катионных примесей с более низкими величинами pK_A . В качестве модельных растворов применяли ацетатный буфер (0.1 М ацетат натрия, подстроенный до pH 4.5 ледяной уксусной

кислотой) и мочу с добавками кветиапина или содержащую его метаболиты. Процедура экстракции следующая:

- промывка патрона 6 мл ацетонитрила;
- кондиционирование 6 мл ацетатного буфера;
- загрузка (8 мл ацетатного буфера с добавкой кветиапина или 5 мл мочи, подстроеной до $pH \sim 5$ уксусной кислотой и 3 мл ацетатного буфера);
- промывка патрона 3 мл ацетатного буфера;
- промывка 3 мл ацетонитрила;
- сушка патрона в течение 1 мин в потоке воздуха;
- элюирование 3 мл смеси дихлорметана, изопропанола и водного раствора аммиака (конц.) в соотношении 78:20:2.

Полученный элюат упаривали в вакууме при температуре 40°C досуха, растворяли в подходящем растворителе и вводили в хроматограф.

Для трех процедур экстракции степень извлечения кветиапина из образцов мочи составила 99.6% при относительном среднеквадратичном отклонении 2.4%. Кветиапин ни в одном случае не был обнаружен в сливах при загрузке и промывках патронов (для модельных растворов на основе ацетатного буфера). Мы не проводили количественных оценок выделения метаболитов **II** и **III**, но эти соединения всегда присутствовали при данном способе очистки на регистрируемых хроматограммах.

Заключение

Несмотря на заметное образование продуктов термолитиза производных и метаболитов кветиапина в условиях ГЖХ, нет никакой необходимости проводить количественные определения посредством частных методик (используя короткие и тонкофазные колонки). Применение ГЖХ-обзорных режимов, предназначенных для наблюдения широкого спектра соединений, имеющих токсикологическое, наркологическое и судебно-химическое значение позволяет получить приемлемые метрологические характеристики для определения кветиапина и его метаболитов. Метод ВЭЖХ-ДМД может быть использован в качестве вспомогательного метода при необходимости определения самого кветиапина и при условии значительного его содержания в исследуемых образцах.

Список литературы

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. 15-е изд. М., Новая Волна. 2006. 1206 с.
2. Skibinski R., Komsta L., Kosztyla I. Comparative validation of quetiapine Determination in tablets by NP-HPTLC and RP-HPTLC with densitometric and videodensitometric detection // J. Plan. Chrom. - Modern TLC. 2008. V. 21, P. 289-294
3. Mandriolia R., Fanalib S., Ferrantia A., Raggi M.A. HPLC analysis of the novel antipsychotic drug quetiapine in human plasma // J. Pharm. Biomed. Anal. 2002. V. 30. P. 969-977
4. Belal F., Elbrashy A., Eid M., Nasr J.J. Stability-Indicating HPLC Method for the Determination of Quetiapine: Application to Tablets and Human Plasma // J. Liq. Chrom. & Rel. Techn. // 2008. V. 31. P. 1283 – 1298

5. Davis P.C., Wonga J., Gefvert O. Analysis and pharmacokinetics of quetiapine and two metabolites in human plasma using reversed-phase HPLC with ultraviolet and electrochemical detection // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999. V. 20. P. 271-282
6. Nirogi R., Bhyrapuneni G., Kandikere V., Mudigonda K., Ajjala D., Mukkanti K. Sensitive liquid chromatography - tandem mass spectrometry method for the quantification of Quetiapine in plasma // *Biomed. Chrom.* 2008. V. 22. P. 1043-1055
7. Kun-yan Li, Ze-neng Cheng, Xin Li, Xue-lian Bai, Bi-kui Zhang, Feng Wang, Huan-de Li. Simultaneous determination of quetiapine and three metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography_electrospray ionization mass spectrometry // *Acta Pharmacol. Sin.* 2004, V. 25. P. 110-111
8. Bellomarino S.A., Brown A.J., Conlan X.A., Barnett N.W. Preliminary evaluation of monolithic column high-performance liquid chromatography with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) chemiluminescence detection for the determination of quetiapine in human body fluids // *Talanta.* 2009. V. 77. P. 1873-1876
9. Atanasov V.N., Kanev K.P., Mitewa M.I. Detection and identification of atypical quetiapine metabolite in urine // *Central European Journal of Medicine.* 2008. V. 3. P. 327-331
10. Pullen R.H., Palermo K.M., Curtis M.A. Determination of an antipsychotic agent (ICI 204,636) and its 7-hydroxy metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography and gas chromatography—mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 1992. V. 573. P. 49-57
11. Maurer H.H., Pflieger K., Weber A.A. *Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites.* Weinheim, Wiley-VCH. 2007. 1432 p.
12. Григорьев А.М., Божко Е.С., Рудакова Л.В. Использование корреляции индексов удерживания на слабополярных фазах для обзорного анализа сложных смесей методом хромато-масс-спектрометрии // *Журн. аналит. химии.* 2009. Т. 64. С. 156-159
13. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 3 ed. (Ed. by Moffat A.C.). London, Pharmaceutical Press. 2004. 1248 p.

Мельник Александра Александровна – врач-судебно-медицинский эксперт судебно-химического отделения, Областное государственное учреждение здравоохранения особого типа «Бюро судебно-медицинской экспертизы», Белгород, факс (4722)-58-61-01

Григорьев Андрей Михайлович – к.х.н., врач-судебно-медицинский эксперт судебно-химического отделения, Областное государственное учреждение здравоохранения особого типа «Бюро судебно-медицинской экспертизы», судебно-химическое отделение, Белгород

Азарова Любовь Витальевна – врач-судебно-медицинский эксперт судебно-химического отделения, Областное государственное учреждение здравоохранения особого типа «Бюро судебно-медицинской экспертизы», судебно-химическое отделение, Белгород

Mel'nik Aleksandra A. – Forensic Medical Expert, Regional Bureau of Forensic Medical Examination, Chemical Department, Belgorod, E-mail chrzond@bel.ru

Grigor'ev Andrei M. – Cand.Chem.Sci., Forensic Medical Expert, Regional Bureau of Forensic Medical Examination, Chemical Department, Belgorod

Azarova Lyubov' V. – Forensic Medical Expert, Regional Bureau of Forensic Medical Examination, Chemical Department, Belgorod