



Определение метаболитов димедрола методами ГХ-МС и ВЭЖХ в моче

Григорьев А.М., Машкова И.В.

ГУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы по Белгородской области», Белгород

Рудакова Л.В.

Воронежская медицинская академия им. Н.Н. Бурденко, Воронеж

Аннотация

Определены характеристики удерживания метаболитов димедрола и ряда сопутствующих соединений (28 компонентов) в условиях газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Приведены примеры их определения в моче. Сопоставлен состав таблеток димедрола и метаболизируемых продуктов. Приведен вариант идентификации трех не описанных ранее соединений

Введение

Димедрол, N,N-диметил-2-(дифенилметокси)-этиламин гидрохлорид (diphenhydramine hydrochloride, DPMH), является важнейшим представителем группы противогистаминных препаратов (блокаторов H₁ - гистаминовых рецепторов), способным оказывать местноанестезирующее и седативное действие, чем обусловлена его широкая применимость в клинической практике [1]. В случае приема значительных доз димедрол проявляет галлюциногенные свойства, что приводит к злоупотреблениям и требует контроля со стороны судебно-медицинских и наркологических служб. Характеристики данного соединения описаны в [2].

Со способами определения димедрола и его метаболитов в биожидкостях млекопитающих (и человека) методами ГХ-МС, ВЭЖХ и капиллярного электрофореза-МС можно ознакомиться в [3-9]. Основное количество метаболитов (до 45-50%) связано в конъюгаты с уроновыми кислотами и аминокислотами. В свободном состоянии можно обнаружить 10-20% дифенгидраминуксусной кислоты, 7-13% N-оксида димедрола, 8-13% дезметилированных продуктов и 1-2% дифенилметанола (бензгидрола). В свободном состоянии экскретируется около 2-8% димедрола. В работе [8] рассмотрено также определение дезаминированного димедрола и продукта окисления по фенильному кольцу (1-(4-гидроксифенил)-фенилметоксиуксусная кислота).

Следует заметить, что, несмотря на значительный период использования димедрола в клинической практике, продукты его метаболизма изучены недостаточно. Димедрол легко гидролизуется по эфирной связи при обработке разбавленными минеральными кислотами, что приводит к образованию бензгидрола и N,N-диметил-2-аминоэтанола; причем наличие

ни одного из этих продуктов не может быть использовано для выводов о злоупотреблениях димедролом. Следовательно, надежность идентификационных характеристик его метаболитов имеет важное практическое значение.

Эксперимент

Хромато-масс-спектральный анализ выполняли на газовом хроматографе Agilent 6890N с кварцевой капиллярной колонкой HP-5ms (длина 30 м, внутренний диаметр 0.25 мм, толщина пленки неподвижной фазы 0.25 мкм). Газ-носитель: гелий, расход через колонку постоянный 1 мл/мин. Использовали два температурных режима колонки. Условия 1 (быстрый обзор): градиент, начальная температура 50°, выдержка 0.5 мин, подъем до 100° со скоростью 99°/мин и выдержка 1 мин, подъем до 300° со скоростью 35°/мин и выдержка 15 мин. Условия 2 (улучшение разделения): градиент, начальная температура 50°, выдержка 0.5 мин, подъем до 100° со скоростью 99°/мин и выдержка 1 мин, подъем до 280° со скоростью 15°/мин и выдержка 30 мин. Испаритель: режим без деления потока (продувка через 0.4 мин), температура 260°, объем вводимой пробы 1 мкл. Температура интерфейса детектора 290°. Детектор: масс-спектрометрический квадрупольный Agilent 5973N, тип ионизации: электронный удар (70 эВ), температура ионного источника 230°, масс-фильтра - 150°. Наблюдали диапазон m/z 50-550 (20-550 для расшифровки спектров неохарактеризованных соединений). Для обработки результатов применяли систему обработки хромато-масс-спектральной информации AMDIS и подтверждали идентификацию компонентов с помощью библиотеки масс-спектров NIST02.

ВЭЖХ-анализ проводили на модульной ВЭЖХ - системе Agilent 1200 с диодно-матричным (ДМД) детектором G1315B. Колонка Eclipse XDB-C18 (4.6*150 мм, 5мкм) с форколонкой XDB-C18 (4.6*12.5 мм, 5мкм), температура колонок 20°, скорость потока элюента 1 мл/мин. Объем вводимой пробы 5 мкл. Использовали два режима элюирования. Для режима 1 (градиент): элюент А (фосфатный буфер с концентрацией 20 мМ, рН 3, подстроенный добавками фосфорной кислоты), элюент В (ацетонитрил). Линейный градиент от А:В = 9:1 до 3:7 за 20 мин. Режим 2 (изократический), состав элюента А:В = 1:1. Детектирование на длине волны 220 нм (ширина полосы 4 нм) при реперной длине волны 360 нм (ширина полосы 100 нм), а также сканирование в диапазоне 190-400 нм (при шаге 2 нм). Идентификацию наблюдаемых соединений проводили по их УФ-спектрам.

Обработка проб. Кислые и основные экстракты образцов мочи готовили добавками соляной кислоты до рН 2 или раствора аммиака до рН 10 и последующей экстракцией этилацетатом. Экстракты упаривали досуха при температуре не выше 40° и остаток растворяли в этилацетате так, чтобы объем полученного раствора составлял 10% от исходного образца мочи. Гидролиз образцов мочи проводили в среде 1 М соляной кислоты при нагревании в кипящей водяной бане 40 мин. Гидролизат экстрагировали хлороформом непосредственно (кислая экстракция) или после добавки водного раствора аммиака до рН 10 (основная экстракция).

Ацетилирование проводили по стандартной методике в смеси уксусного ангидрида и пиридина (1:1), сухие продукты растворяли в этилацетате.

Таблетки димедрола (производство АО «Белмедпрепараты», Беларусь) измельчали, суспендировали в метаноле, фильтровали и после необходимого разведения вводили в хроматограф. Гидролиз и (или) ацетилирование проводили так же, как и для образцов мочи (после упаривания метанола).

N-оксид димедрола синтезировали из димедрола-основания (полученного экстракцией димедрола гидрохлорида из водного аммиачного раствора, рН 9-10, в этилацетат), по стандартной методике в растворе метанола с добавкой концентрированной перекиси водорода.

Все использованные реактивы марки «хч» или «чда». Ацетонитрил «Panreac», для ВЭЖХ, градиентной чистоты.

Для сопоставления компонентов, обнаруженных разными методами, использовали способ отбора ЖХ-фракций и их анализ методом ГХ-МС после экстракции содержащихся в них компонентов из элюента в этилацетат.

Обсуждение результатов

ГХ-МС. В указанных образцах нами обнаружено более 50 соединений дифенилметанового ряда. Основными (хотя и не обязательными) признаками дифенилметанового производного можно считать наличие m/z 167 (дифенилметил-катион) и m/z 165 (флуоренил-катион, продукт перегруппировки).

К сожалению, значительное количество компонентов ряда не дает молекулярных ионов в спектрах электронной ионизации, а масс-спектры и индексы удерживания, встречающиеся в литературе и электронных библиотеках, разноречивы. В табл. 1 приведены ГХ-характеристики удерживания (RI, индексы Ковача для используемой колонки в двух условиях) только для наиболее надежно идентифицированных соединений для двух температурных программ. Их структуры таковы: 1: $(\text{CH}_3)_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ (диметиламиноэтанол), 2: $(\text{CH}_3)_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{OC}_2\text{H}_5$, 3: $(\text{CH}_3)_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$, 4: $[(\text{CH}_3)_2\text{N}(\text{CH}_2)_2]_2\text{O}$, 5: $(\text{CH}_3)_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}_2$, 6: $\text{R}_1 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{H}$, 7: $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_2 = \text{H}$, 8: $\text{R}_1 = \text{OC}_2\text{H}_5$, $\text{R}_2 = \text{H}$, 9: $\text{R}_1 = \text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{O}$, $\text{R}_2 = \text{H}$, 10: $\text{R}_1 = \text{Cl}$, $\text{R}_2 = \text{H}$, 11: $\text{R}_3 = \text{H}$ (бензофенон, ВРН), 12: $\text{R}_1 = \text{OH}$, $\text{R}_2 = \text{H}$ (бензгидрол, ВНД), 13: $\text{R}_1 = \text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$, $\text{R}_2 = \text{H}$, 14: $\text{R}_1 = \text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, $\text{R}_2 = \text{H}$, 15: $\text{R}_1 = \text{OH}$, $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$, 16: $\text{R}_1 = \text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{R}_2 = \text{H}$ (димедрол, ДРМ), 17: $\text{R}_1 = \text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, $\text{R}_2 = \text{OH}$, 18: $\text{R}_1 = \text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$, $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$, 19: $\text{R}_1 = \text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$, $\text{R}_2 = \text{H}$, 20, 21: $\text{R}_3 = \text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$, 22: $\text{R}_1, \text{R}_2 = \text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$, 23: $\text{R}_1 = \text{O}(\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$, $\text{R}_2 = \text{H}$, 24: $\text{R}_1 = \text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, $\text{R}_2 = \text{H}$.

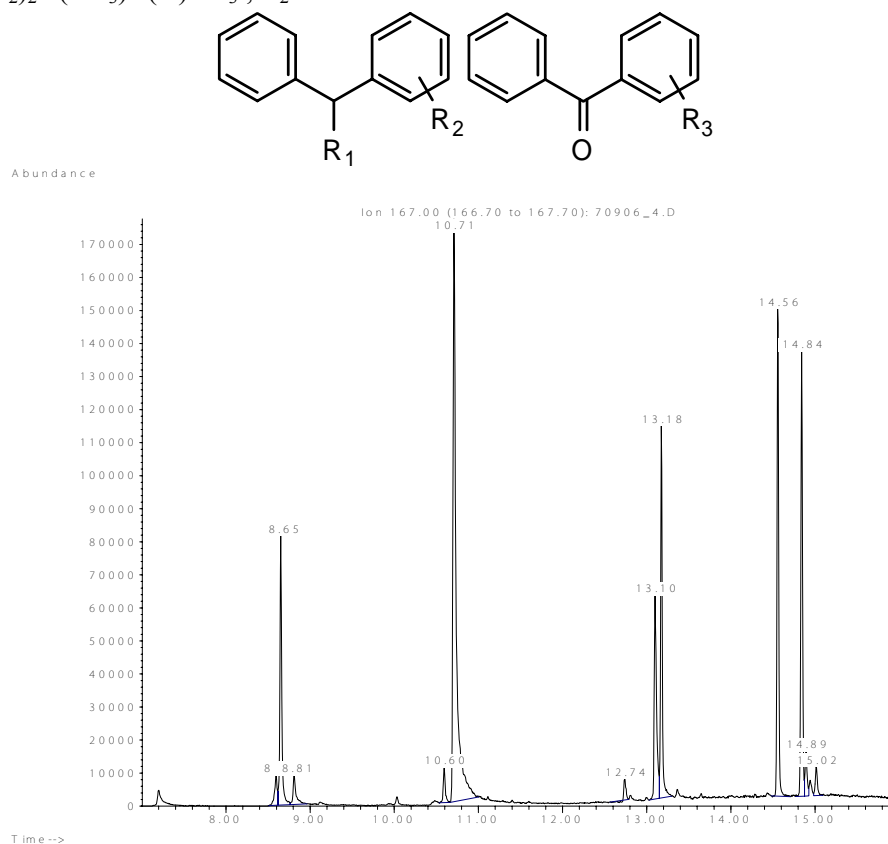


Рис. 1. Селективная (m/z 167) масс-хроматограмма (фрагмент) основного экстракта образца мочи. Условия 2. Времена удерживания (мин) компонентов: 8.65 (9), 8.81 (10), 10.71 (16), 13.10 (23), 13.18 (28), 14.84 (27). Сигнал 14.56 мин принадлежит обычному загрязнителю – диоктилфталату

Как примеси к основному действующему компоненту, в таблетках димедрола обнаружили соединения 1, 3, 4, 6, 10-13. Также в следовых количествах найдены компоненты 20, 21 (изомеры по положению ацетата в кольце). Судя по характеру удерживания и их МС можно предположить, что это 2- и 4- бензоилфенилацетаты соответственно. Компонент 5 (диметиламиноэтанола акрилат) обнаружили в гидролизатах таблеток; его идентификация представляется надежной. Любопытно отметить, что соединения 1, 6, 10-12, 27 найдены как в таблетках, так и в образцах мочи, - следовательно, 6, 10, 27 могут быть использованы в качестве дополнительных признаков приема димедрола. В гидролизованных образцах мочи диметиламиноэтанол (1) и бензгидрол (12) разумеется, являются основными компонентами. Продукты алкилирования диметиламиноэтанола (2) и бензгидрола (7, 8) могут появляться в образцах при использовании метанола и этанола в качестве растворителей.

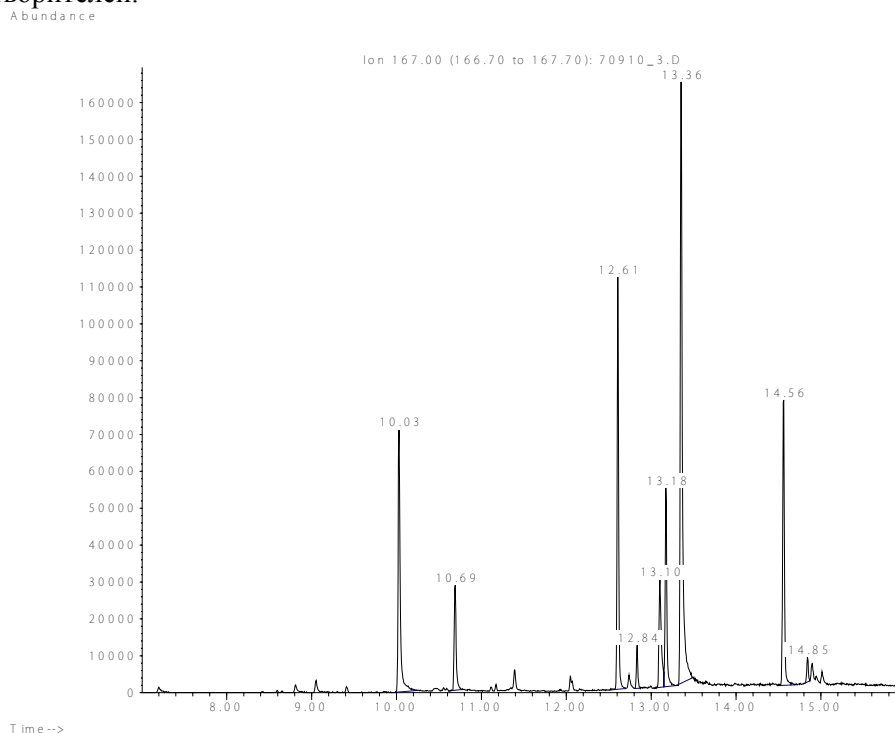


Рис. 2. Селективная (m/z 167) масс-хроматограмма (фрагмент) основного экстракта образца мочи после ацетилирования. Условия 2. Времена удерживания (мин) компонентов 12.61 (26), 13.36 (24)

Соединения 9, 15, 16 (димедрол), 23, 24 найдены в основных экстрактах образцов мочи; соединение 18 – в этих же экстрактах после ацетилирования. Соединения 14, 17, 23 обнаружены в кислых экстрактах, компонент 22 – также после ацетилирования. В основных экстрактах гидролизованных образцов мочи найден компонент 1, и после ацетилирования – соединение 19. В графе «Примечания» табл. 1 указан способ МС-идентификации (1 – библиотека NIST02, 2 – литературные данные, 3 – направленный синтез).

Можно предположить структуры еще четырех наблюдаемых компонентов. Соединение 25 (RI 1877, 1861 для условий 1,2) характеризуется предполагаемым молекулярным ионом с m/z 223, (что может отвечать брутто-формуле $C_{15}H_{13}NO$ и структуре $R_1 = OCH_2CN$, $R_2 = H$) и может являться продуктом дегидратации амида дифенгидраминуксусной кислоты ($R_1 = OCH_2C(O)NH_2$, $R_2 = H$), поскольку обнаружено в основных ацетилированных экстрактах образцов мочи. Соединение 26 (RI 2219, 2212) образуется при ацетилировании смесей, содержащих N-оксид димедрола (9), имеет предполагаемый молекулярный ион m/z 225, что соответствует вероятной формуле $C_{15}H_{15}NO$ и структуре $R_1 = OCH_2CHNH$, $R_2 = H$). Компонент 27 ($C_{16}H_{22}$, 1,1,2,2-тетрафенилэтан, RI 2631, 2606), найденный как в таблетках, так и в экстрактах образцов мочи идентифицировали по характеру МС в области малоинтенсивных $m/z >220$ и по

наличие m/z 334 (библиотека NIST02). Наконец, соединение 28 обнаружено в значительных количествах в основных экстрактах образцов мочи. Его предполагаемый молекулярный ион малоинтенсивен (m/z 313, около 0.8% от наиболее интенсивного иона спектра), но подтвержден измерениями при малых энергиях ионизации (12-15 эВ). Данное соединение характеризуется значительным удерживанием как в условиях ГХ (RI 2327, 2313), так и ВЭЖХ ($t_R = 22.98$ мин для условий 1), не изменяется при ацетилировании и не проявляет выраженных ионогенных свойств в условиях ВЭЖХ. Предполагаемая формула $C_{18}H_{19}NO_4$ и структура $R_1 = OCH_2C(O)N(CH_3)OC(O)CH_3$, $R_2 = H$ подтверждены величинами m/z осколочных ионов.

Таблица 1. Параметры удерживания идентифицированных соединений

№	Соединение	M	ГХ, RI		ВЭЖХ		Идент.
			1	2	t_R , мин	k'	
1	Диметиламиноэтанол (M)	<u>89</u>	802	810			1
2	Диметиламиноэтил-этиловый эфир	<u>117</u>	835	832			1
3	Диметиламиноэтанол ацетат	<u>131</u>	914	912			1
4	<i>di</i> -Диметиламиноэтиловый эфир	160	1078	1071			1
5	Диметиламиноэтанол акрилат	<u>143</u>	1358	1356			1
6	Дифенилметан	<u>168</u>	1459	1448			1
7	BHD метилат	<u>198</u>	1588	1577			1
8	BHD этилат	<u>212</u>	1632	1621			1
9	DPHM N-оксид (M)	241	1637	1626	12.21	0.47	3
10	BHD хлорид	<u>202</u>	1665	1649			1
11	ВРН	<u>182</u>	1672	1655			1
12	BHD (M)	<u>184</u>	1680	1663	16.73	3.38	1
13	BHD ацетат	<u>226</u>	1737	1726	21.23	10.9	1
14	DPHM дезамино-ОН (M)	<u>228</u>	1889	1870			2
15	BHD метокси-	<u>214</u>	1891	1879			2
16	DPHM	255	1928	1913	11.47	0.40	1
17	DPHM дезамино- <i>di</i> -ОН (M)	<u>244</u>	1990	1974			2
18	BHD метокси- ацетат	<u>256</u>	1995	1982			2
19	N-Бензгидрилацетамид	<u>225</u>	2019	2000			1
20	ВРН гидрокси, ацетат 1	<u>240</u>	2037	2020			2
21	ВРН гидрокси, ацетат 2	<u>240</u>	2082	2064			2
22	BHD гидрокси, диацетат	<u>284</u>	2136	2125			2
23	DPHM <i>di</i> -дезметил ацетат (M)	269	2327	2302			2
24	DPHM дезметил ацетат (M)	283	2368	2344	17.28	3.55	1

Примечания к таблице. Подчеркнуты молекулярные массы тех соединений, для которых характерны молекулярные ионы. «(M)» - метаболит.

ВЭЖХ. Жидкостная хроматография с ДМД, безусловно, не является оптимальным методом анализа подобных смесей. Это объясняется как малой характеристичностью УФ-спектров дифенилметановых соединений, так и тем, что для достижения большей чувствительности необходимо детектирование на малых длинах волн, где поглощение веществ матрицы также велико. Как правило, пики наблюдаемых компонентов загрязнены соэлюирующимися соединениями матрицы. Тем не менее, метод ВЭЖХ вполне пригоден для подтверждения определения как самого димедрола, так и сопутствующих соединений, а также для поиска высокополярных компонентов, хотя ни деметилированные производные димедрола (в основных экстрактах), ни дифенгидраминуксусная кислота ($R_1 = OCH_2COOH$, $R_2 = H$) в кислых экстрактах нами не найдены.

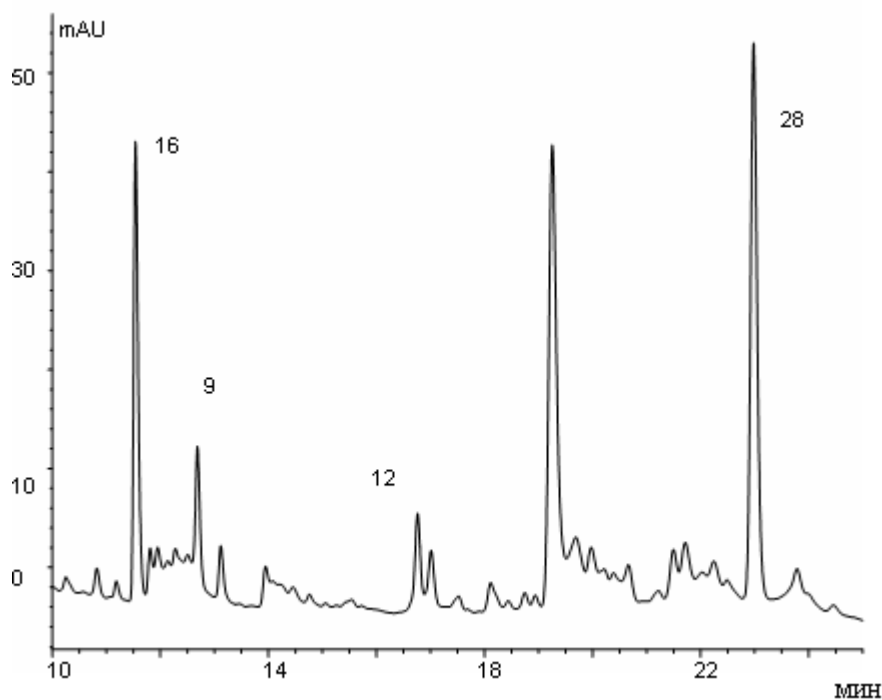


Рис. 3. Фрагмент ВЭЖХ-хроматограммы (градиентный режим 1) основного экстракта образца мочи

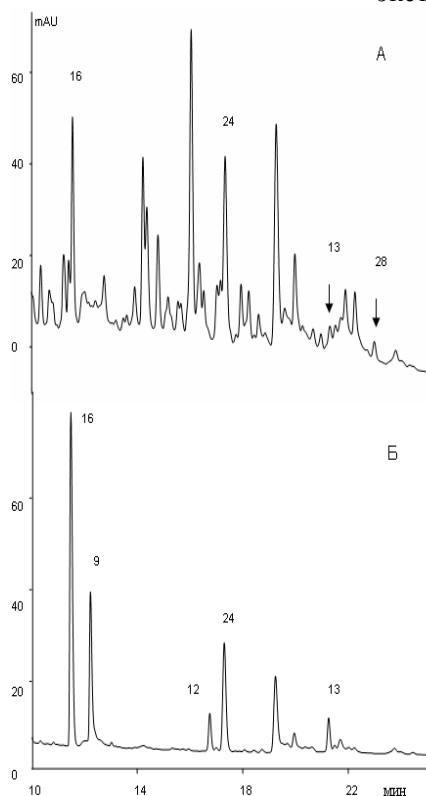


Рис.4. Фрагмент ВЭЖХ-хроматограммы (градиентный режим 1) основного ацетилированного экстракта образца мочи (А). Модельная смесь (Б)

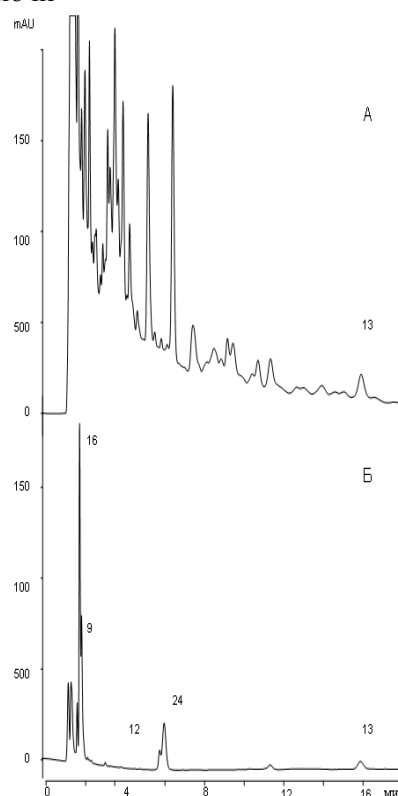


Рис.5. ВЭЖХ-хроматограмма (изократический режим 2) основного ацетилированного экстракта образца мочи (А). Модельная смесь (Б)

В табл. 1 указаны характеристики ВЭЖХ-удерживания обнаруженных соединений (t_R для условий 1и k' для 2) На рис.3 приведен фрагмент хроматограммы (градиент, условия

1) основного экстракта мочи; на рис.4 – продуктов ацетилирования. Этот режим пригоден для поиска неидентифицированных ранее компонентов. Гидролиз образцов мочи позволяет суммировать метаболические формы дифенилметанового ряда в единый наблюдаемый компонент (бензгидрол). Этот компонент может быть определен как в исходном состоянии, так и после ацетилирования (в наших измерениях спектральная чистота пиков составляла >990 и >995 соответственно). Как и для метода ГХ, желательнее определять этот компонент в виде ацетата, что позволяет увеличить его удерживание и (за счет лучшего отделения от компонентов матрицы) значительно повысить надежность определения. На Рис. 5 приведена хроматограмма (условия 2, изократические) гидролизата мочи (основная экстракция и ацетилирование) в сравнении с хроматограммой модельной смеси. Этот режим пригоден для серийных определений димедрола.

Список литературы

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: «Новая волна». 2006. 1206 с.
2. Clarke's isolation and identification of drugs. Ed. by Moffat A.C. London.: "The Pharmaceutical Press". 1986. p. 1223.
3. Tonn G.R., Mutlib A., Abbott F.S., Rurak D.W., Axelson J.E. Simultaneous analysis of diphenhydramine and a stable isotope analog, (²H₁₀)-diphenhydramine, using capillary gas chromatography with mass selective detection in biological fluids from chronically instrumented pregnant ewes // *Biol. Mass Spectrom.* 1993. V. 22. P.633–642.
4. Baldacci A., Prost F., Thormann W. Identification of diphenhydramine metabolites in human urine by capillary electrophoresis-ion trap-mass spectrometry // *Electrophoresis.* 2004. V. 25. N. 10-11. P. 1607-1614.
5. Kumar S., Rurak Dan W., Riggs K.W. Simultaneous determination of diphenhydramine, its *N*-oxide metabolite and their deuterium-labeled analogues in ovine plasma and urine using liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry // *J. Mass Spect.* 1999. V. 33. P. 1171-1181.
6. Gergov M., Robson J. N., Ojanpera I., Heinonen O.P., Vuori E. Simultaneous screening and quantitation of 18 antihistamine drugs in blood by liquid chromatography ionspray tandem mass spectrometry // *Forensic Science International.* 2001. V. 121. N. 1-2. P. 108-115.
7. Удалов А.В., Тарашук Е.Ю. Применение микроколоночной градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения димедрола в моче при комбинированных отравлениях // *Судебно-медицинская экспертиза.* 2006. № 2. С. 34.
8. Wasfi I.A., Abdel Hadi A.A., Elghazali M., Alkateeri N.A., Hussain M.M., Hamid A.M. Comparative Pharmacokinetics of Diphenhydramine in Camels and Horses after Intravenous Administration // *Veterinary Research Communications.* 2004. V. 27. N. 6. P. 463-473
9. Melnick R. Toxicology and carcinogenesis studies of diphenhydramine hydrochloride in F344/N rats and B6C3F1 mice / National toxicology program, Publication No. 89-2810. National Institutes of Health (U.S. Department of health and human services), September 1989. p. 176.