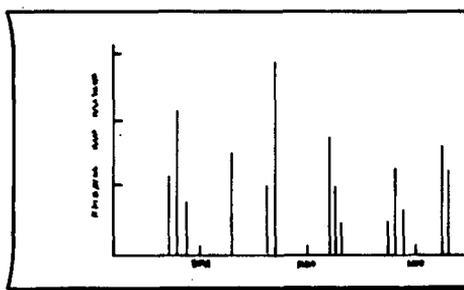
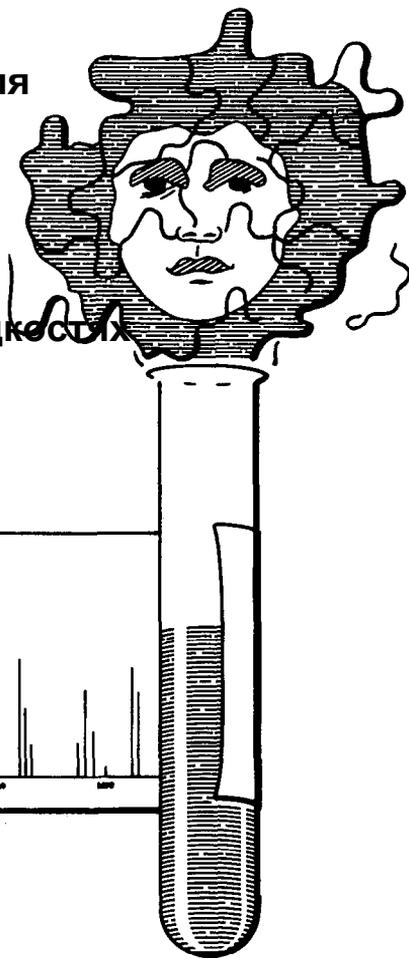


Research

MONOGRAPH SERIES

ГХ / МС анализы для
злоупотребляли
наркотиками в
биологических жидкостях



ГХ / МС анализы для злоупотребляли наркотиками в жидкостях организма

Rodger Л. Фольц, доктор философии

Центр Университета человека
токсикологии Юта Солт-Лейк-Сити, штат
Юта 64112

Allison Ф. Фентимэн, младший, доктор философии

Ruth В. Фольц
Battelle Columbus Laboratories Columbus, Ohio
43201

NIDA Research Монография 32 августа

1980

Департамент здравоохранения и социальных служб Службы общественного
здравоохранения
Алкоголизма, наркомании, и администрация психического здоровья

Национальный институт по борьбе со злоупотреблением
наркотическими средствами отдела исследований 5600
Fishers Lane Роквилле 20857

Серия NIDA Research Монография подготовлена Отделом исследований Национального института по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами. Его главная цель состоит в том, чтобы обеспечить критические обзоры исследовательских проблемных областей и методов, содержание государственной ультрасовременной конференций, интегративных научных обзоров и значительного первоначального исследования. Его двойная акцент издания является быстрым и целенаправленным распространением в научную и профессиональную общественность.

Редакционный совет

Аврам Goldstein, MD

Фонд исследований наркомании Пало-Альто,
Калифорния

Джером Яффе, MD

Колледж врачей и хирургов Колумбийского
университета, Нью-Йорк

Риз Т. Джонс, доктор медицинских наук

Лэнгли Портера Нервно институт Калифорнийский
университет в Сан-Франциско, штат Калифорния

Уильям McGlothlin, Ph.D.

Факультет психологии, Лос-Анджелес
Лос-Анджелес, Калифорния

Джек Мендельсон, доктор медицинских наук

Alcohol и наркомании: Научно-исследовательский центр
Гарвардской медицинской школы Маклин больницы Белмонт,
Массачусетс

Хелен Nowlis, Ph.D.

Управление наркотик образования DHHS
Вашингтон, округ Колумбия

Ли Робинс, Ph.D.

Вашингтонский университет Школа медицины Сент-Луис, штат
Миссури

Серия NIDA исследований Монография

Уильям Pollin, MD

ДИРЕКТОР, NIDA

Marvin Снайдер, Ph.D.

ДИРЕКТОР, ОТДЕЛ ИССЛЕДОВАНИЙ, NIDA

Роберт К. Петерсен, Ph.D.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Элеонора В. Waldrop

ОТВЕТСТВЕННЫЙ РЕДАКТОР

**ГХ / МС анализы для
злоупотребляли наркотиками
в жидкостях организма**

БЛАГОДАРНОСТЬ

Поддержка разработки и оценки хромато анализов / описанных в этой монографии и подготовке рукописи была предоставлена Национальным институтом по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами, контракты ADM 45-74-140, 42-72-183 HSM и 271- 77-3419 в Battelle Columbus Laboratories, и контракт 271-80-3719 к Центру по населенным токсикологии, а также страховой институт дорожной безопасности, proj- ЭСТ 6762 в центре токсикологии человека.

Правительство Соединенных Штатов не поддерживает и не благоприятствует какой-либо конкретный коммерческий продукт, товар, или поставщик. Торговля или фирменные наименования и наименование поставщиков, входящих в данной публикации используются только потому, что они считаются необходимыми в контексте представленной информации.

Библиотека Конгресса числа Каталог карт 80-600143

DHHS номер публикации (ADM) 80-1014 Печатный 1980

NIDA Исследование Монография индексируется в *Index Medicus*.
Они выборочно включены в охвате *Biosciences информационная служба*, *Chemical Abstracts*, *Current Contents*, *психологические Рефераты*, а также *Psychopharmacology рефераты*.

предисловие

В монографии представляет коллекцию методов количественной анализа нескольких важных препаратов злоупотреблений со стороны тех- Nique газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ / MS). Труды устроены учебник мода, главы, посвященных конкретные наркотикам, чтобы помочь исследователям в создании процедур GC / MS опробования в своих собственных лабораториях.

Эти анализы особенно подходят для базовых исследований по фармакологии и фармакокинетики препаратов злоупотребления. Судебная токсикология, которая иногда требует высокой чувствительности и специфичность анализа проб, представленного ОГО / MS, является еще одной важной областью применения. Даже тогда, когда альтернативный способ, такой как immu- poassay доступен для таких анализов, ГХ / MS часто является единственным средством обеспечения анализа подтверждения. Чувствительность и специфичность ГХ / MS особенно важны для исследований воздействия лекарственных средств на безопасность дорожного движения.

Кроме того, спрос на лег-нального законодательства, связанные с наркотиками и безопасности дорожного движения растет, и приведение в исполнение таких законов потребует соответствующих выборочных анализов. Уникальные характеристики ОГО / MS аналитического метода делают его единственным средством определения уровней препарата при определенных обстоятельствах.

Присущая сложность техники, однако, часто отговаривает следователь приступают к исследованиям, которые включают его использование. В то время, когда основные вопросы, лежащие в основе злоупотребления наркотиков призыва к более изощренным методам сбора данных, эта монография должны предоставлять информацию, необходимую, чтобы сделать один из этих процедур проще устанавливать и поощрять новые направления исследований.

Marvin Снайдер, Ph. D. Директор Отдела по исследованиям
Национального института по борьбе со злоупотреблением
наркотическими средствами

Предисловие

Вскоре после создания Национального института по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами в 1974 году, разработка аналитической программы подчеркивающие газовой хроматографии / масс-спектрометрии (ГХ / МС) был инициирован. Большая часть этой программы была направлена на разработку, тестирование и возможной публикации методов ГХ / МС, подходящих для ряда злоупотребляли наркотиками, представляющих интерес для этого института.

это было

считает, что путем предоставления тщательно описаны количественные процедуры для этих препаратов, больше исследователей будет предложено перейти на несколько критически важных областей исследования.

Основной сегмент этой разработки и тестирования программы была проведена Battelle (Columbus Laboratories и в Центре токсикологии человека в Университете штата Юта. Эти ГХ / МС Методы методы ионизации подчеркнула важность роли размер химических которые часто предлагают значимые преимущества Косяк в чувствительности и специфичность более методик ионизации электронным ударом.

Каждый из методов, описанных в этой монографии был испытан с помощью одного или нескольких независимых лабораторий в целях оптимизации как саму процедуру и четкость его представления. Это полевые испытания проводили Battelle и состояли из посылки участвующих лабораторий ряда известных стандартных образцов наряду с информационными брошюрами, включенными здесь в качестве главы. Участвующие лаборатории затем настроить метод в своих собственных средствах и проанализировали образцы с шипами. Проблемы с либо учебным материалом или методом позволили Баттеллю сделать много улучшений, чтобы обеспечить самую высокую вероятность успеха неопытный лаборатории с одним из этих анализов. Эта монография представляет собой объединенные усилия многих людей и превратилась в его нынешнее состояние в течение нескольких лет. Мы надеемся, что это позволит сэкономить исследовательские исследователям драгоценного время устанавливающего количественные очерков этих препаратов в своих собственных лабораториях. Основные принципы ОГО / МС количественного анализа, представленные здесь, должны быть полезными в создании процедур для других лекарственных средств, а также.

Ричард Л. Ястребов, Ph.D. Отдел исследований

содержание

Предисловие.	V
Marvin Снайдер	
Предисловие.	VII
Ричард Л. Ястребов	
Глава 1	Введение, 1
Глава 2	Экспериментальные соображения и операции, общие для всех анализов., 5 Фенциклидин (PCP).
Глава 3, 25
Глава 4	Метаквалон., 0,39
Глава 5	Метадон., 0,51
Глава 6	Δ^9 -Тetraгидроканнабиол (THC) и два его метаболита, 11-гидрокси- Δ^9 -THC и 11-нор-9-карбокси- Δ^9 -THC., 0,62
Глава 7	Кокаин и его основной метаболит, бензоилэвгонин. 90
8	Морфин., 110 Диазепам и его основной метаболит,
Глава 9	N-Desmethyl- диазепам., 128 Амфетамин. 150 метамфетамин., 165
Глава 10	Глава
11	Глава 12
Глава 13	2,5-диметокси-4-метамфетамин (DOM)., 179 Мескалин., 189

Введение

Сочетание газовой хроматографии и масс-спектрометрии (ГХ / МС) стала широко признана в 1960-х годах как наиболее чувствительный и универсальный инструмент доступный для идентификации летучих органических соединений.

Он не был до 1970-х годов, однако, и разработка методов мониторинга выбранных ионов, что потенциал ГХ / МС для количественного анализа в целом было оценено. В настоящее время представляется очевидным, что количественное измерение конкретных органических соединений в сложных смесях станет основным применением описанных катион GC / MS просто потому, что его чувствительность, точность и Versatility не имеют себе равных по любой другой технологии, в том числе популярной пар иммунологических анализы.

Быстрое увеличение использования ГХ / МС произошло несмотря на несколько серьезных ограничений и сдерживающих факторов. Основное ограничение является то, что для соединения для анализа с помощью ОГО / МСА он должен иметь достаточную летучесть и термостабильность, чтобы пройти через газ хроматографическую колонку нетронутую в парообразном состоянии, или быть в состоянии конденсации в производном, которое может сделать это; это требование запрещает анализ ГХ / МС для 80 до 90 процентов от известных органических соединений. К счастью, это не является серьезной проблемой для токсиколога, поскольку большинство препаратов и их метаболитов среди структур, которые могут быть проанализированы с помощью ГХ / МС. Более серьезные сдерживающие к более широкому использованию ГХ / МС в токсикологических и клинических лабораториях расход GC / MS приборов и относительно высокий уровень подготовки и навыков, необходимых для эффективного использования этих инструментов. Несмотря на то, в будущем вряд ли будет уменьшено в Будущем, последние, несомненно, станут менее обременительным как надежность GC / MS приборов улучшаются, а его конструкция упрощается.

Цель этой монографии заключается в сборке, в пределах одного VOLUME, подробные описания процедур ГХ / МС для количественного измерения некоторых лекарственных средств и их метаболитов, которые представляют особый интерес для Национального института по борьбе со злоупотреблением наркотиками (NIDA). Процедуры были разработаны на Баттлелл Columbus лабораториях и Центра по населенным токсикологии в Университете штата Юта, и широко оценены в обоих этих лабораториях. Все анализы используют дейтерий-меченных внутренних стандартов и газовой хроматографии на колонке упакованы в сочетании с хемикальной ионизационной масс-спектрометрии. Эта комбинация была выбрана по следующим причинам:

- Стабильный изотоп, меченные аналоги представляют собой почти идеальные внутренние стандарты, потому что их химические и физические свойства практически идентичны тем, которые филиалы соответствующих немеченых соединений.

- Большинство аналитических лабораторий с системами ГХ / МС больше знакомы с использованием насадочных колонн, чем с капиллярными колонками.
- Химическая ионизация масс-спектрометрия, с использованием метода, выбранный мониторинг ионов, является наиболее чувствительным методом обнаружения доступного. С хемии-кала ионизация большинство препаратов эффективно ионизируется, ионный ток образца концентрируется в одном или два значения м / г, и вероятность помех от ионов, генерируемых колонкой кровотока или компоненты биологического экстракта сведен к минимуму.

Каждый препарат был первоначально предметом отдельного аналитического руководства. Решение было впоследствии сделано, однако, объединить руководства в одном томе, с каждой главе, посвященной специ- сифс препарата и его метаболитов. В результате этой эволюции рукописей, каждая глава относительно автономна и включающий в себя наряду своего собственного список литературных источников и своя последовательностью номера для рисунков, таблиц и структурных рисунков. По этой причине, любой, кто имеет прочность на разрыв, чтобы прочитать монографию от корки до корки найти чрезмерное повторение определенных инструкций и объяснений. Большинство читателей, однако, не будет со- рого со всеми препаратами, включенных в монографии, и выбрать для чтения только выбранные разделы. Тем не менее, для того, чтобы повторять до минимума,

Исходя из того, что аналитик, который должен определять концентрацию препарата в биологических образцах должны знать кое-что о препарате, мы включили в каждой главе справочной информации, которую мы считаем уместным и полезным. Этот опыт включает в себя:

- краткая история препарата и его применения
- резюме фармакологии и метаболизма лекарственного средства
- обзор литературы процедур для количественного анализа препарата и его метаболитов, с акцентом когда особым на других ОМ / МС анализы для лекарственного средства, или анализы, которые могут рассматриваться в качестве альтернативы ГХ анализа / МСА
- подборка физических, химических и спектроскопических данных по препарату

Несмотря на то, ГХ / МС инструменты теперь известные приборы во многих клини- ческих и токсикологических лабораторий, слишком часто их использование ограничено идентификации неизвестных путем сопоставления их электронным ударом

Масс-спектры с эталонными спектрами. Мы надеемся, что эта монография будет способствовать более аналитикам использовать мощь ГХ / МС в качестве Количественной техники.

Это, конечно, важно, чтобы определить, когда использовать ГИ / МС для конкретного анализа наркотиков и когда использовать какую-либо другую технику. Анализы, описанные в этой монографии венные, как правило, можно использовать либо в качестве эталонных методов для проверки и контроля качества других методов, или как метод выбора, когда другие доступные методы не предлагают адекватную чувствительность, специфичность и точность. Последняя ситуация часто является фактор в судебной токсикологии, поскольку исход судебного разбирательства может зависеть от надежности анализа наркотиков.

ГХ / МС может также уменьшить затраты на внедрение нового анализа наркотиков. В ряде случаев мы попытались использовать «менее дорогую» технику для конкретного анализа наркотиков, только чтобы обнаружить, что анализ не имеет адекватную чувствительность или специфичность. Каждый раз, когда мы решили проблему с помощью ГХ / МС, но ценное время и деньги были израсходованы.

Еще одна причина, почему ГХ / МС часто может быть экономически по сравнению с другими хроматографическими методами является то, что его специфичность часто позволяет ре- шить использование простых и быстрых процедур экстракции. Мало того, что простая процедура извлечения более низкую стоимость за счет экономии времени, но это также уменьшает возможность человеческой ошибки. Степень, в которой процедура извлечения может быть упрощена, зависит, однако, от уровня требуемой чувствительности. Например, тетрагидро- каннабиол является психоактивным веществом при концентрациях в крови 10 нг / мл и менее. При таких низких концентрациях процедура экстракции и очисток многоступенчатой требуется для того, чтобы устранить помехи от эндогенных компонентов в биологической среде. Контрастируют, фармакологический значительные концентрации в крови лекарственного средства, такие как метаквалон гораздо выше (> 100 нг / мл);

Исключительное использование химической ионизации (CI), в каждом из препарата, как говорит, а не электронный удар (EI) ионизации, заслуживает ком- MENT. В качественном анализе основное преимущество CI является то, что он обычно генерирует видный пик, из которого можно вычислить молекулярный вес соединения.

В количественном анализе препаратов

она имеет два преимущества по сравнению с EI ионизации: 1) ионный ток анализируемое вещество обычно концентрируется в одном или двух составных-Характерными масс, которые являются особенно подходящими для выбранного мониторинга ионов, и 2) большинство лекарственных средств и их метаболиты могут быть efficient- ют ионизованных путем селективного газа-реагента, такого как аммиак. Эти fea- нкц обычно позволяют лучше эффективную чувствительность с CI, чем с EI ионизации. Тем не менее, аналитики во многих лабораториях, неохотно используют химическую ионизацию. Часть этого нежелания, несомненно, отражает отсутствие знакомства с CI. Однако, это также верно, что дуга более экспериментальные переменные в CI, чем в ЭИ ионизации, и задача оптимизации и управления этими переменными может отпугнуть некоторых аналитиков. По этой причине мы включили в главе 2, и в обсуждении каждого из анализа наркотиков процедур, предложений и рекомендаций по использованию CI.

Целый ряд новых хроматографических и масс-спектрометрических методов находятся на разных стадиях развития и оценки для анализа наркотиков. Стекланные капиллярные колонки быстро увеличиваются в заселения *arity* и по-прежнему будет использоваться вместо насадочных колонн *whenever* больше разделения мощности и более высокой чувствительности необходимы. Коммерческой доступности комбинированных жидкостный хроматограф / масс-спектрометр систем (ЖХ / МС) делает возможным анализ полярных наркотиков и метаболитов непосредственно, без дериватизации. Новая методика MS / MS, в которой масс-анализатор используется вместо газового хроматографа, чтобы отделить компоненты смеси до идентификации или количественной оценки с помощью масс-спектрометрии, может в конечном счете вытеснит ГХ / МС, где большое количество образцов должны быть проанализированы. В заключение, отрицательные ионы с химической ионизация была показана, способны значительно более высокой чувствительности, чем положительные ионы CI для ОГО / МСА анализа соединений, которые обладают высоким сродством к электрону. Применение отрицательных ионов CI к анализу диазепам и N-desmethyldiazepam обсуждается в главе 9.

Ни один из этих новых методов не используются в ГХ / МС анализов наркотиков в этой монографии, в первую очередь потому, что в то время анализы были разработаны методы, такие как LC / MS, отрицательный ион CI и MS / MS были на ранних стадиях развития и были доступны лишь в нескольких научно-исследовательских лабораторий.

Теперь очевидно, однако, что каждый

из этих методов предлагает захватывающие возможности, которые однозначно удовлетворяют специфические аналитические потребности.

Вполне вероятно, что к тому времени,

эта монография распространяется, многие читатели уже имели опыт работы с одним или несколькими методами.

Авторы выражают глубокую признательность за вклад многих людей и организаций, которые оказывали содействие в разработке этих анализов и подготовки этой монографии. В первую очередь, мы благодарим Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами (NIDA) за финансовую поддержку. Мы особенно высоко оценили руководство, *encourage*-MENT, и многое полезное обсуждение с мониторами проекта, докторами. Ричард Л. Ястребов и Роберт Э. Willette. Кроме того, мы хотели бы поблагодарить Страховой институт дорожной безопасности за их финансовую поддержку, которая позволила нам для дальнейшей оценки и уточнения некоторых из этих анализов. Те, кто принимал участие в лабораторных исследований включают д-р Давид А. Knowlton, доктор Полин А. Кларк, доктор Денис СК Лин, доктор Эдит Г. Leightly, д-р Брюс А. Петерсен, г-н Уоррен Е. Бреслер, мистер. Bruce J. Hidy, и д-р Франк В. Ворона в Battelle Columbus Laboratories, и г-н Деннис М. Чин и нега Шерил Л. Джексон в Центре токсикологии человека. Другие, которые помогли оценить методы включают: д-р Дан С. Пирса, лаборатория криминалистики, Санта-Ана, Калифорния; Доктор Джек Д. Henion, штата Нью-Йорк Колледж ветеринарной медицины Корнельского университета, Итака, штат Нью-Йорк; Д-р Джеймс Фергюсон, токсикология факультет, Университет штата Огайо, Колумбус Огайо; Д-р Даниэль Р. DiFeo, младший, Analytical Chemistry центр, Университет Техаса Научного центра здоровья в Хьюстоне, штат Техас; и мисс Памела Ahearn, штат Род-Айленд Департамент здравоохранения, Провиденс, Род-Айленд. Санта-Ана, Калифорния; Доктор Джек Д. Henion, штата Нью-Йорк Колледж ветеринарной медицины Корнельского университета, Итака, штат Нью-Йорк; Д-р Джеймс Фергюсон, токсикология факультет, Университет штата Огайо, Колумбус Огайо; Д-р Даниэль Р. DiFeo, младший, Analytical Chemistry центр, Университет Техаса Научного центра здоровья в Хьюстоне, штат Техас; и мисс Памела Ahearn, штат Род-Айленд Департамент здравоохранения, Провиденс, Род-Айленд. Санта-Ана, Калифорния; Доктор Джек Д. Henion, штата Нью-Йорк Колледж ветеринарной медицины Корнельского университета, Итака, штат Нью-Йорк; Д-р Джеймс Фергюсон, токсикология факультет, Университет штата Огайо, Колумбус Огайо; Д-р Даниэль Р. DiFeo, младший, Analytical Chemistry центр, Университет Техаса Научного центра здоровья в Хьюстоне, штат Техас; и мисс Памела Ahearn, штат Род-Айленд Департамент здравоохранения, Провиденс, Род-Айленд.

Наконец, особая благодарность д-р Брайан С. Финкл в Центре токсикологии человека за его неоценимую помощь в подготовке и рассмотрении монографии рукописи.

Экспериментальные соображения и операции

Общий для всех анализов

Каждый из GC MS анализов / описанных в данной монографии включает в себя следующие шаги:

1. Добавление дейтерия меченного внутренни стандарта для биологических образцов
2. Экстракция растворителя из биологических образцов
3. ГХ / МС анализ экстракта с использованием химического ionization и выбранного мониторинга ионов
4. Расчет концентрации лекарственного средства в биологическом образце, на основе соотношения ионных токов, генерируемых лекарственного средства и внутреннего стандарта.

В этой главе рассматриваются общие соображения, относящиеся к каждой из этих операций, и представляет свои рекомендации относительно подготовки калибровочных графиков и процедур контроля качества аналитических данных.

Несмотря на то, все анализы используют химическую ионизацию (CI), процедуры могут быть модифицированы для электронного удара (EI) ионизации. «Изменение Ибис, как правило, приводит к снижению чувствительности и специфичности Ве- вызывают наиболее распространенными ионов в масс-спектрах EI этих препаратов, как правило, не столь удовлетворительным для выбранного мониторинга ионов в качестве обильных ионов в спектрах химической ионизации масс (1). Более жесткое требование этих анализов является то, что система ГХ / МС должен быть способен непрерывно контролируя ионные токи в двух или более выбранных масс ионов. Полезность выбранного иона контро- toting (также называемый «множественный обнаружения ионов» и «масс-fragmento- графии») теперь настолько широко признано, что практически все ГХ / МС Sys- TEMS, предназначенные для биомедицинских применений имеют такой возможности,

Типы и источники ОБРАЗЦОВ

Поскольку концентрация в крови лекарственного средства, как правило, дает наилучшую корреляцию с фармакологическим действием препарата, предпочтительные биологические образцы для анализа наркотиков в цельной крови, плазма или сыворотка. Все ГХ / МС анализов в этой монографии являются

способный измерять концентрацию лекарственного средства в крови, по крайней мере столь же низко как минимальный уровень, при котором лекарственное средство оказывает детектируемого физио- логический эф фект.

Если выбор образца доступен, плазма, как правило, предпочтительнее. Кровь должна быть собрана в вакуумированных трубках, содержащих фторид натрия для ингибирования бактериального и ферментативного действия и натрий окса поздний или гепарин для предотвращения коагуляции. Кровь должна быть центрифугирована как можно скорее, чтобы отделить плазму от красных кровяных клеток, и плазму переносили в силилированных стеклянных трубок, оснащенных тефлоном винтовой крышкой.

Если хранение или транспортировка плазмы необходимо, она должна быть заморожена и поддерживается в замороженном состоянии до тех пор, пока добыча может быть выполнена. Несколько гарантированных 24-часовая служба доставки посылок в настоящее время доступна для большинства городов в Соединенных Штатах. Эти услуги также стоит дополнительных затрат на перевозку биологических образцов.

Анализы ГХ / МС, описанные здесь, применимы и к другим физио- логических жидкостей и тканей, в том числе моча, слюна, спинно-мозговой жидкости, желудочном соке, и гомогенатах из жировой ткани, печени, почек и т.д. Некоторые образцы, особенно с высоким содержание жира, может потребовать дополнительной очистки с целью удаления не- местителя интерферирующих эндогенных соединений. Это может быть достигнуто в случае основных лекарственных средств с помощью процедуры «обратно» экстракции, в котором лекарственное средство извлекается из органического растворителя в водную кислоту. Кислоты раствор затем подщелачивают и препарат повторно экстрагируют в органический растворитель.

Тетрагидроканнабинол (глава 6) является уникальным среди препаратов, обсуждаемых в данной монографии в том, что это очень липофильный, неосновой препарат, и, следовательно, трудно отделить от липидов, присутствующих в phy- siological образцов. По этой причине, анализ THC является разделительной перегородкой сularly Ярким примером мощности ГХ / МС, чтобы выборочно измерьте специфическое соединение в сложной смеси подобных IALS материнского.

Внутренние стандарты

Чувствительность системы ГХ / МС зависит от большого числа фак- торов, некоторые из которых трудно контролировать. Следовательно, необходимо использовать внутренний стандарт, если точные количественные Измерения при должны быть сделаны. Идеально подходят внутренний стандарт ведет себя тождественно к анализируемому веществу в течение экстракции, хроматографическая отстоящая топки и процессов ионизации, так что массовое отношение ад- DED внутреннего стандарта на аналит будет оставаться в стороне от какого-либо из этих операций. Стабильные изотопные меченые аналоги приходят ближе к удовлетворению характеристики идеальных внутренних стандартов. Изобутила этикетка Тоупа оказывает очень незначительное, но обычно незначительное влияние на физико-химических свойства соединения,

Основной сдерживающий фактор для использования стабильных изотопов меченых препаратов в качестве вну- треннего стандартов является их ограниченной доступностью и высокой стоимостью тех, которые доступны.

В знак признания этой проблемы,

Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотических средств заключил контракт синтеза стабильных изотопов маркированы аналогов многих оскорбленных препаратов и их метаболитов. Миллиграммовые количества этих соединений доступны бесплатно в уполномоченные следователи занимаются исследованиями повторно Quiring количественный анализ этих препаратов. Запросы Вне зависимости ИНГА наличия определенных изотопов маркированы препаратов и метаболизируемого Lites следует направлять по адресу:

Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами
Отдел исследований / Исследование технологии отделения 5600 Fishers
Lane Rockville, MD 20857 301-443-5280

Несколько коммерческих фирм, специализирующихся в области синтеза и продажи стабильных изотопов меченых соединений. К ним относятся:

Merck Sharp Доум Canada Division Limited Изотоп

PO Box 899
Pointe Claire-Dorval, Квебек H9R 4P7 Канада

514-697-2823

KOR Изотопы 56 Rogers
Street
Cambridge, MA 02142 USA
517-661-8220

Prochem
19, Ox Bow Lane Summit, NJ 07901
USA 201-273-0440 Chromacol Ltd.

73 Friern Барнет Lane London N20
OXT Англия 368- 7666

Stohler Изотоп Chemicals, Inc. 49 Jones
Автомобильный
Waltham, MA 02154 USA
617-891-1827

К сожалению, проблемы, связанные с продажей контролируемых веществ отбивают некоторые поставщик от участия с этой категорией препаратов. Merck Sharp Dohme Канада синтезирует и продает стабильный изотоп меченых контролируемые наркотики, но покупатели в Соединенных Штатах, должны получить американское разрешение правительства для импорта, прежде чем Merck может грузить продукт.

Поскольку рынок стабильных изотопов меченых соединений еще относительно невелик, их стоимость высока, когда из коммерческих источников. По этой причине лаборатория с органическим синтезом עם pertise может избрать, чтобы синтезировать их собственный внутренний изотоп помечен

стандарты. Экспериментальные процедуры были опубликованы готовят в дическом многих препаратах дейтерия маркирована и метаболитов (2,3).

Несколько факторов дуги важно иметь в виду при выборе изотопа меченого соединения для использования в качестве внутреннего стандарта. Самое главное, изотоп не должен проходить обмен по любому из условий, возникающих в процессе стадия экстракции, дериватизации или хроматографии анализа, ни те, в источнике ионов масс-спектрометре. Замена этикетки дейтерия водорода в источнике ионов иногда происходит неожиданное вращение в условиях химической ионизации. Так, например, был найден препарат, меченый с тремя атомами d_3 uterium, присоединенных к третичной аминим метильной группе пройти интенсивный обмен между атомами deu- terium и водородом, когда препарат был подвергнут химической ионизация метана (3). К счастью, обмен не происходит, когда аммиак используют в качестве газа-реагента.

Дополнительные потенциальные проблемы, связанные с использованием дейтерия маркированы аналогами, как внутренние стандарты обсуждаются в книге Милларда, озаглавленной Количественный масс-спектрометрии (5). В частности, пример цитируется, в котором простагландин метили с четырьмя атомами дейтерия в, по-видимому устойчивых положений в молекуле, но после длительного хранения в метаноле значительного обмена гидро- ген для дейтерия было установлено, что произошло. На основе этого экс-Perience, Миллард рекомендует, чтобы исходные растворы дейтерий меченых соединений должны быть проверены на регулярной основе для явных свидетельств обмена водородно-dcutrium.

Проблема обмена побудило некоторых аналитиков использовать ^{13}C или ^{15}N этикетки, а не d_3 uterium.

Однако, дейтерий, как правило, гораздо проще включить в молекулу, чем другие тяжелые изотопы, и поэтому, несомненно, будет по-прежнему наиболее часто используется метка для внутренних стандартов. Важным моментом является то, что аналитик должен быть в курсе возможных проблем, связанных с использованием дейтерия маркированы внутренних стандартов и тщательно оценивать каждое применение определенного внутреннего стандарта гетерофазной план приступающих обширной серии анализов.

Вторые важный момент, касающиеся маркировки изотопа, что изотопный вариант должен иметь молекулярную массу три или более единиц массы больше, чем немеченое соединение. Это происходит потому, что в природе содержание тяжелых изотопов (в первую очередь ^{13}C) органических соединений приводит к ионам значительной интенсивности на одной и двух единиц массы над каждым углеродосодержащих ион в масс-спектре соединения, в.

В принципе вклады этих естественно происходящие ионы изотопов могут быть рассчитаны и вычитаются из ионных токов в результате внутреннего стандарта, при измерении хижины практики интенсивности изотопа меченых ионного пика легче и точнее, если не существует никакого вклада от других ионов.

Конечно, другие типы соединений могут использоваться в качестве ^{13}C внутренних стандартов, когда подходящий изотоп меченого аналога не доступен. Так, например, гомологи и другие структурно подобные соединения были использованы в качестве внутренних стандартов и часто дают удовлетворительные результаты (6-8). Тем не менее, когда они могут быть получены, стабильный изотоп

меченые аналоги являются первым выбором для внутренних стандартов большинства практиков количественного масс-спектрометрии (9).

ПОДГОТОВКА КАЛИБРОВКА графикам

Процедура рекомендуется для приготовления калибровочных графиков («стандартные кривые») включает в себя добавление фиксированного количества меж- конечного стандарта на аликвоты соответствующего тела жидкости, содержащей известное количество аналита. В «шипках стандартов», затем экстрагируют, дериватизированные, и анализируют с помощью точно процедур, которые будут использоваться для неизвестных образцов. Калибровочный график строится путем построения измеренного отношения ионных тока высот пиков коррелирует реагирует на аналит и внутренний стандарт в сравнении с квантованностью Tity аналита добавленной к каждому образцу. Любые неточности в измерении, которые происходят в подготовке калибровочного графика будут влиять на точность всех последующих количественных определений, которые используют этот калибровочный график. Следовательно, подготовка точного калибровочного графика является чрезвычайно важной.

1) количество анализируемого вещества в каждый образец должен быть точно известно, и 2) точно так же кван- Tity внутреннего стандарта должен быть добавлен к каждому образцу, используемому для предварительной калибровки срезать график, как добавляются к каждому из неизвестных образцов на.

По общему правилу образец среда, используемая для приготовления калибровочной кривой должно быть как можно более близкими к образцу анализируемой среды.

Если неизвестные состоят из образцов плазмы, то биологическими чesкие стандарты, которые будут использоваться в создании калибровочного графика может быть получен путем добавления точных объемов стандартных растворов анализируемого вещества в аликвоты пула плазмы, полученной из местного банка крови. Это, конечно, важно, чтобы установить, что пул плазмы полностью свободен от анализируемого вещества, или любых других соединений, которые вли ни на анализ.

В идеале, стандартный раствор анализируемого вещества и внутренний стандартный раствор должны быть добавлены таким образом, что биологическая среда не изменяется, и лекарственные соединения вводят в молекулярную среду, которая точно имитирует, что биологические образцы, которые будут проанализированы. По этой причине, как правило, предпочтительно использовать водные стандартные растворы. Тем не менее, некоторые препараты имеют очень мало растворим в воде, так что трудно приготовить водные SO- lutions в концентрациях, необходимых. Большинство препаратов растворимы в метаноле, а также добавление небольших количеств метанольных растворов в биологические среды вызывает относительно незначительное физическое и химическое изменение. Ради единообразия стандартных решений для всех препаратов и метаболитов в этой монографии, получает в метаноле. Кроме того, мы выбрали 100 мкл, как объем, чтобы быть добавлены к 1 мл-объемами биологов цы образца в мета- пойс стандартных растворов. Этот объем метанольного раствора представляет собой компромисс в том, что он достаточно большой, чтобы быть легко обойтись с хорошей точностью, но не настолько велико, что вызывает обширная белка до- осадков.

Как отмечалось ранее, важно, чтобы добавить точно такое же количество внутреннего стандарта для каждого анализируемого образца, то есть к обоим стандартам и неизвестным.

Это на самом деле не нужно

знать вес внутреннего стандарта добавил, до тех пор, как он требовательный одина- кова для всех образцов. Тем не менее, обычной практикой является решить заранее примерное количество внутреннего стандарта, которые будут добавлены к каждому образцу, так как отношение аналита к внутреннему стандарту может быть наиболее точно, когда они присутствуют в подобных концентрациях измеряется. Следовательно, количество добавленного внутреннего стандарта в образце должна давать концентрации промежу- между самым низким и высоким ожидаемым аналита концентрациях, или более точно, концентрация внутреннего стандарта должна быть такой, что наименьшее ожидаемое массовое соотношение аналит внутренни стандарт приблизительно должен быть равен обратный сам высоким ожидаемым коэффицент. Таким образом, если кто-то желает, чтобы измерить концентрации лекарственного средства в диапазоне от 1 до 1000 нг / мл,

Некоторые аналитики могут способствовать более низкую концентрации внутреннего стандарта на том основании, что он является более трудным для измерения низких концентраций лекарственного средства, чем высокие концентрации, и, следовательно, внутренний стандарт концентрация должна быть выбрана таким образом, чтобы облегчить точное измерение»низких уровней препарата. С другой стороны, relative- ют большое количество внутреннего стандарта иногда используются для того, чтобы действовать в качестве «носителя», чтобы свести к минимуму потери анализируемого вещества за счет адсорбции на активных центрах на поверхности экстракционных сосудов и внутри колонны GC (7). Однако эффект «носитель» не является существенным фактором, за исключением очень низких концентраций аналита, должно прибыть ниже приблизительно 10 нг / мл (8).

Калибровочный график должен включать в себя измерение, как минимум, из четырех различных концентраций аналита плюс пустого, т.е. образца без добавления анализируемого вещества. По крайней мере, три образец должен быть предварительно подготовлен и проанализирован при каждой концентрации, чтобы оценить дисперсию в измерениях при каждой концентрации. Концентрации аналита, используемые при получении калибровочного графика должна In- заключить, крайности концентраций, как ожидается, будет найдено в неизвестный, так как линейность должна быть продемонстрирована, не предполагаются. Остальные точки на графике должны соответствовать промежуточным концентрациям.

Так как это важно, чтобы добавить такой же объем стандартного раствора для каждого образца жидкости организма, при подготовке калибровочного графика, необходимо подготовить серию стандартных растворов, содержащих дифрактометр концентрацию ferent анализируемого вещества. Схема разбавления предназначена для обеспечения семи концентраций аналита, охватывающих диапазон от 1 до 1000 нг / мл показаны в таблице 1. Для того, чтобы использовать схему, готовит стандартные растворы аналита и внутренний стандарт имею- щие точно измеренные концентрации приблизительно 0,10 мг / мл в метаноле, как описано в разделах экспериментальной процедуры в рамках каждой из глав наркотиков. Схема требует разбавления

использовать семь 10-мл мерных колб, один 1-мл мерной пипетки, три 2-мл мерной пипетки, и три 5-мл мерных пипеток.

Таблица 1. Разбавление СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ
Аналит СТАНДАРТНЫЕ РЕШЕНИЯ

Развести 1 мл 0,10 мг / мл анализируемого вещества исходного раствора до 10 мл с получением 10,0-мкг / мл раствора. Разбавляют 5 мл 10,0 мкг / мл раствора до 10 мл с получением 5,0-мкг / мл раствора.

Развести 2 мл 5,0 мкг / мл раствора до 10 мл с получением 1,0-мкг / мл раствора. Разбавляют 5 мл раствора 1,0-мкг / мл до 10 мл с получением / мл раствора 500 нг.

Развести 2 мл / мл раствора 500 нг до 10 мл с получением / мл раствора 100 нг.

Разбавляют 5 мл / мл раствора 100 нг-до 10 мл с получением / мл раствора 50,0-нг.

Развести 2 мл раствора 50,0-нг / мл до 10 мл с получением / мл раствора 10,0 нг-.

Ровно 100 мкл каждого из этих стандартных растворов добавляют к 1 мл жидкости тела, свободного от наркотиков вместе со 100 мкл 400-нг / мл раствора внутреннего стандарта. Подготовьте / мл стандартного раствора 400 нг путем разбавления 1 мл 0,10 мг / мл исходного раствора внутреннего стандарта на 250 мл метанола. Каждый из образцов жидкости тела будет содержать 40 нг внутреннего стандарта и концентрацию анализируемого вещества, показанную в правой колонке в таблице 2.

Готовят три или более шипы образцов тела жидкости в каждом из перечисленных концентраций. Извлечение и анализ каждого образца, как описано в разделе Экспериментальные процедуры в соответствующем разделе наркотиков. Участок соотношения высот пиков анализируемого вещества и внутреннего стандарта к количеству анализируемого вещества, добавленного к образцу жидкости организма. Калибровочный график затем получается путем построения прямой линии, которая наилучшим образом соответствует построенные точки. Наилучшим образом подходит прямой линии может быть определено путем визуальной оценки, или более точно, по Методу наименьших квадратов», в котором, что прямая линия, которая минимизирует сумму квадратов вертикальных отклонений от линии.

На рисунке 1 приведен пример генерируемой компьютером графика калибровки. Существенные особенности графика являются наклон, у-интер-СЕРТ, линейный диапазон анализа, и дисперсия Измерения при различных концентрациях аналита.

В этом примере

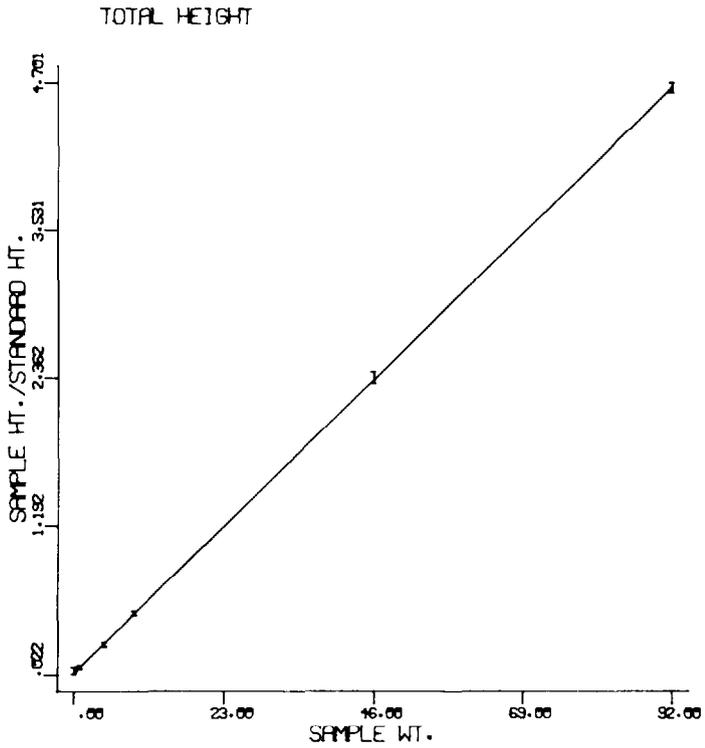


РИСУНОК 1. Калибровочный график ДЛЯ АНАЛИЗА тетра- HYDROCANNABINOL В ПЛАЗМЕ

ТАБЛИЦА 2.

СХЕМА ЕСТЬ аналит и внутренний стандарт (IS) К жидкости организма образцов для подготовительной калибровки ГРАФОВ

<u>Добавить в 1 мл жидкости тела</u>		Результирующая аналита концентрация (Нг / мл)
100 мкл 400- нг / мл раствора	+ Нет аналит	0
	+ 100 μ l из / мл раствора анализируемого вещества 10 нг	1
"	+ 100 μ l из / мл раствора анализируемого вещества 50-нг	5
"	+ 100 μ l из / мл раствора анализируемого вещества 100 нг	10
"	+ 100 μ l в нг / мл раствора анализируемого вещества 500	50
"	+ 100 мкл 1 мкг раствора анализируемого вещества / мл	100
"	+ 100 μ l от 5 мкг раствора анализируемого вещества / мл	500
«»	+ 100 мкл 10 мкг раствора анализируемого вещества / мл	1000

Дисперсия обозначается вертикальными линиями, представляющими относительное стандартное отклонение при каждой концентрации, измеренной. Наклон и у-перехватывают являются функциями, используемыми для вычисления количества анализируемого вещества в неизвестном на основании текущего коэффициента отклика ионов. Анализы с использованием стабильных изотопов меченных внутренние стандарты обычно дают калибровочные линии с положительными у-перехватывают. Величина у-перехват отражает долю внутренних стандартных молекул, не содержащих тяжелые изотопы (немеченных молекул). Большая гамма-интер- СЕРТ может существенно ограничить чувствительность анализа.

Важное преимущество в использовании стабильного изотопа меченого интер- нальных стандарты является то, что наклон калибровочной прямой должна оставаться постоянной до тех пор, как составы стандартных растворов остаются неизменными и те же объемы стандартных растворов добавляют к телу образцы жидкости. Из-за почти идентичные химические и физические свойства анализируемого вещества и его изотопы меченого аналога, их соотношение веса не должен влиять на любой

в значительной степени изменениями в процессах экстракции, дериватизации, хроматографических и масс-спектрометрических. По этой причине практик в нашей лаборатории, чтобы определить новые калибровочные графики только тогда, когда новые стандартные растворы готовили дуги, или когда анализ контрольных образцов, содержащие известные концентрации препарата показывает недопустимую дисперсию от истинных значений.

Если концентрация лекарственного средства в неизвестном образце оказывается больше, чем самой высокой концентрации, используемой при подготовке калибровочный график, образец должен быть повторно анализировали после разбавления водой или физиологическим раствором (как правило, 1:10), с тем чтобы привести его концентрическими трация в пределах крайних калибровочного графика. Альтернатива практика добавления большего количества внутреннего стандарта в образец менее удовлетворительная, поскольку он требует под-готовки нового калибровочного графика.

ОБРАЗЕЦ ДОБЫЧА

Одним из важных критериев, которыми руководствовались наш выбор и оцени- Ation процедур подготовки проб было то, что они должны быть как простой и быстрой, насколько это возможно, все еще обеспечивая адекватное восстановление и разделение аналита из соединений, которые могут помешать ГХ / МС количественному. Очень высокая чувствительность и селективные тельности по ОМУ / МСУ часто допускают использование относительно простых процедур экстракции, и мы попытались в полной мере использовать эту функцию.

Второй серьезной проблемой является сведение к минимуму потери аналита вследствие адсорбционным, испарения или разложения. Даже если применение стабильных изотопов меченных внутренних стандартов может компенсировать потерю ро- ции в аналита с помощью этих процессов, любая потеря аналита будет снижать чувствительность анализа. Потеря анализируемого вещества за счет адсорбции на поверхности стекла, в частности, проблема, когда количество анализируемого вещества находится в низком диапазоне нанограмм. Адсорбция может быть сведена к минимуму с помощью силилирования всех стеклянных поверхностей, с которыми раство- ров аналита будет вступает в контакте. Коммерческие препараты доступны для жидкофазного силилирования стеклянных поверхностей (например, Glas-Treet, Peris Chemical Co., Morton Grove, IL 60053). Однако,

Все изделия из стекла должно быть тщательно очищено перед силилированием. Самый простой и тщательный метод удаления органических загрязнений из стеклянной посуды, чтобы испечь его в муфельной печи. Жалению, муфельная печь достаточной емкости для обработки нормальной лаборатории компании gatory стеклянной посуды дорого купить и работать. ванны хромовой кислоты также могут быть использованы, чтобы удалить все следы органического материала из стеклянной посуды, но они грязны и являются угрозой безопасности. Следовательно, в большинстве лабораторий посуда очищается путем промывки с помощью моющего раствора с последующим тщательным ополаскиванием дистиллированной водой. Окончательное полоскание с уксусом помогает обеспечить удаление любого оставшегося органического остатка (11).

Это практика в нашей лаборатории, чтобы использовать высокие растворители чистоты для приготовления стандартных растворов и всех образцов извлечений, даже несмотря на помехи от растворителей примесей не столь большой проблемы в ГХ / МС анализах, как в большинстве других методов лекарственного анализа. Растворители высокой чистоты из нескольких коммерческих источников, оказались удовлетворительными. Мы не сочли необходимым redistill растворителей.

Некоторые из препаратов, обсуждаемых в данной монографии весьма изменчивы, поэтому необходимо соблюдать осторожность, чтобы избежать испарительной потери препарата при концентрации экстракта. Шаги, которые были предприняты, чтобы свести к Мизе испарительной потери анализируемого вещества включают в себя:

1. Устранение необходимости концентрации экстрактов, используя очень небольшое количество экстракционного растворителя (см анализы для метаквалона, кокаина и диазепам).
2. Используя высоко летучие растворители, такие как метилхлорид, гексан, или 1-хлорбутан, который может быть удален нагреванием при умеренных температурах (от 40 до 60 °C) при слабом токе воздуха или азота.
3. Добавление небольшого количества (от 10 до 20 мкл) с высокой температурой кипения жидкости экстракта, чтобы действовать в качестве «хранитель растворителя» во время испарительной концентрации.

Процедуры анализа летучих основных лекарственных средств, такие как амфетамин часто указуют добавление кислоты до испарительного ции концентраций для того, чтобы превратить лекарственное средство в энергонезависимую соль. В нашем испытать использование хранителя растворитель, таком как диметилформамид (ДМФА) является более эффективным средством снижения потерь из-за испарение таких препаратов (см анализы для фенциклидин, метадон, каннабинола, тетрагидро амфетамин, метамфетамин, мескалина и DOM). Нов-когда-либо, важно установить, что хранитель растворитель не оказывает неблагоприятного воздействия на ГХ / МС анализа. Например, мы обнаружили, что ДМФ не могут быть использованы в комбинации с трифторуксусной годов- гидрида для дериватизации амфетамин. По-видимому ДМФ подавляются удаление путем выпаривания трифторуксусной кислоты, образовавшейся в реакции дериватизации и последующих инъекций сильнокислой смеси отрицательно сказывается газовая хроматография три- fluoroacetamide производной. Эта проблема была избежать при использовании N-метил-бис (трифторацетамид)

вместо из трифторуксусная anhy-
dride подготовить производное амфетамин трифторацетамид (см анализы на амфетамин, метамфетамин, мескалин и DOM).

КАЛИБРОВКА И ВЫПОЛНЕНИЯ ОЦЕНКА ГХ / МС

Несмотря на значительные улучшения в стабильности и надежности, газовый хроматограф / масс-спектрометры остаются одним из наиболее внима- ние требующих аналитических инструментов.

В дополнение к наличию сложная электронная схема, массы-спектрометр включает в себя основные компоненты, которые могут работать только под высоким вакуумом. В случае утечки развиваться в вакуумной системе, или если ионизатор, масс-анализатор, или детектор загрязняются, производительность инструмента

ухудшается. Тем не менее, некоторые загрязнения неизбежны, так как образцы введены и эффективно разлагают в вакуумной системе прибора. Кроме того, газовые хроматографические колонки имеют конечное время жизни, которые часто снижаются до нескольких недель при анализе больших Num- Берса сырых биологических экстрактов. По этим причинам важно, чтобы оценить общую производительность системы при регу- лярных и частых интервалах.

Определенным образом, при котором система ГХ / МС настроен и cali- brated, и ее производительность оценивается, будет меняться в зависимости от различных входов инстру ментов, с уровнем производительности, необходимой для анализа более частные, и в соответствии с личными предпочтениями оператора. Процедуры, описанные здесь, оказались удовлетворительными в наших лабораториях, и предназначены в качестве руководства для оказания помощи читателям в создании систематической схемы подходит для их собственного ежедневного инструмента «выезд из.»

Подробное обсуждение настройки окна и оценка эффективности про- цедуры выходит за рамки данной главы. Вместо этого акцент здесь процедур и предложения, которые не могут быть включены в операторском и техническом обслуживании, но мы оказались полезными при подготовке для выполнения видов анализа, описанный в данной монографии.

Процедура оценки производительности

Перед включением ионизатора нити и напряжение электронного умножителя для получения масс-спектров **это хорошая практика, чтобы проверить давления в источнике ионов (<10- з мм) и в анализаторе (<10- 6 мм), а** также давление напора в колонку ГХ, чтобы гарантировать, что никаких серьезных утечек не произошло. После этой предварительной проверки, установите колонку ОИ при максимальной температуре, которые будут использоваться для анализа, блюдать и электронный удар масс-спектральный фон с и без гелия газа-носителя, поступающего в источник ионов. Некоторое увеличение в фоновом режиме будет происходить, когда газ-носитель вводят в масс-спектрометр. Тем не менее, очень большое увеличение **background является причиной для беспокойства. Если интенсивность ионов из-за воздух [M / Z (N 28. 2+), 32 (O 2+), 40 (Ar +) и 34 (CO 2+)] стать аномально большой; утечка в системе GC указывается. Наиболее** распространенные места утечек воздуха в системе GC являются инжектор перегородки и разъем column фитинги. Под метана или химического аммиака ионизационных зации условий воздушные пики не будут видны, и все же утечка воздуха может значительно влиять на чувствительность прибора. Там- носового важно проверить наличие утечки воздуха перед переключением на химическую ионизацию. Появление аномально интенсивных пики ионов при более высоких массах свидетельствует о том, что колонна ОИ должна быть в дальнейшем увели- кондиционера или заменен.

Далее, введение метана в источник ионов, чтобы служить в качестве агента CI повторно газа. Обычно это делается путем изменения газа ГХ-носителя от гелия до метана, хотя некоторые химической ионизации масс-спектрометры требуют использования сепаратора в ГХ / МС линии передачи, в этом случае газ-реагент метан вводится в источник ионов через отдельный на входе. Уменьшить электронный умножитель

напряжение (к $\sim 1,2$ кВ) и ток эмиссии нити (в ~ 50 микроампер), чтобы предотвратить возможное повреждение электронного умножителя, и наблюдать за масс-спектр CI метана. Он должен быть похож в спектре, показанном на рисунке 2. Пик при m/z 19 связано с протонированной воды и часто бывает довольно большим, в частности, просто тер AF- прибор был вниз для очистки и обслуживания. Размер пики воды, как правило, может быть уменьшен в течение ночи СИСТЕМЫ, отжиг. Однако, если аммиак должен быть использован в качестве газа-реагента, адсорбированная вода в системе вряд ли будет влиять на ионизацию молекул образца.

Возвращает напряжение электронного умножителя и ток накала к их нормальной эксплуатации клапанов, и **квоточить небольшое количество (около 10-5 Парциальное давление мм) из соответствующего эталонного соединения**, такие как пер- fluorotributylamine (часто упоминается как PFTBA или FC-43) в источник ионов и наблюдать его масс-спектр CI метана. Относительные интенсивности ионов в масс-спектрах CI часто сильно зависит от температуры источника ионов. При температуре источника приближен 150°C массами-спектр ДИ метана перфтортрибутиламина должен выглядеть подобно тому, который показан на рисунке 3. При более высоких температурах исходных высоких масс ионы имеют тенденцию к снижению в избытке повторно нигилиционным низкую массу ионов. Любой из самых распространенных ионов при m/z 219 и 414 в масс-спектре CI метана из perfluorotributylamine может быть использована для оптимизации исходных потенциалов, в зависимости от того, который находится ближе всего к анализируемому веществу и внутренних ионов стандартных, которые будут контролироваться.

В масс-спектрометрии, разрешающей способности и чувствительности обратно повторно вентиляцию. Обычно масс-спектрометр настроен, чтобы дать блок повторно раствор, то есть разделение базовой линии между последовательными целыми масс-пиков. Однако при количественном анализе с использованием выбранного мониторинга ионов, выигрыш в чувствительности может быть достигнуто за счет уменьшения разрешения масс и, тем самым увеличивая ионный ток, проходящий через масс-анализатор. Степень, в которой разрешение может быть снижено ограничено специфичностью, необходимой, так и специфичность непосредственно связана с разрешением, уменьшение разрешения увеличит вероятность помех от других ионов. В наших лабораториях масс-спектрометр, как правило, доводят до единицы разрешения, если ионы, подлежащих мониторингу имеют массу ниже 300,

После того, как масса спектральное разрешение было установлено и ионного источника потенциалов оптимизированы, калибровка массы системы должны быть проверены и при необходимости повторной калибровки.

Если анализ будет выполняться предполагает использование аммиака в качестве газа-реагента, то лучше вводить аммиак в источник ионов через входной линии, которая находится рядом или концентрические с ГХ / МС линии передачи. Мы обнаружили, что введение газообразного аммиака через входное отверстие в источник ионов в местоположении, противоположный газ на вход несущего дают менее удовлетворительные результаты.

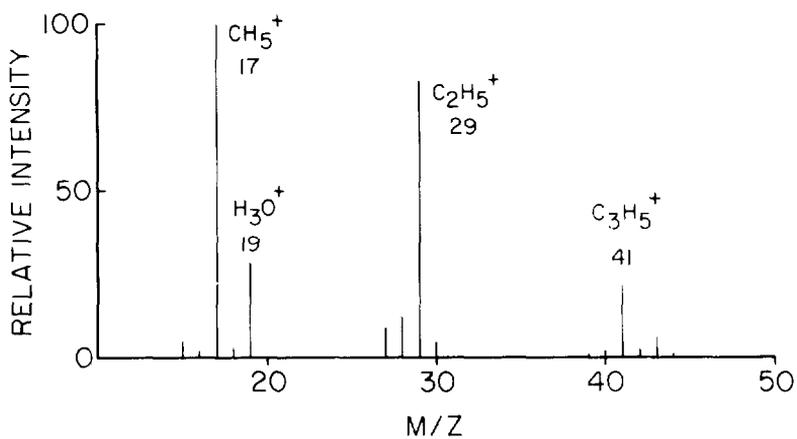


Рисунок 2. МЕТАН газа-реагента ИОНОВ (Источник ионов температура, 150 ° C; Давление, 1 x 10⁻³ мм)

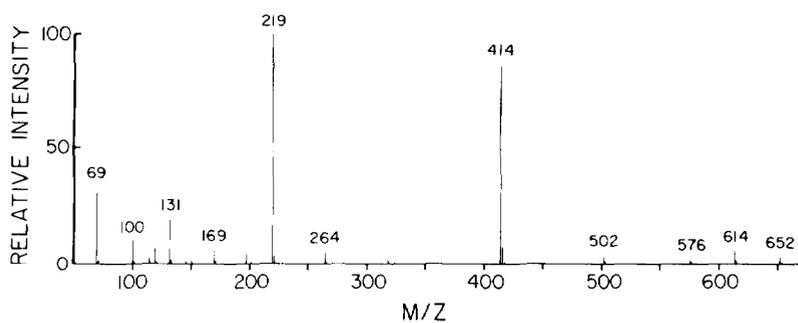


Рисунок 3. МЕТАН ДИ масс-спектр PERFLUOROTRIBU-
TYLAMINE (квадрупольный масс-анализатор Источник ионов ТЕМПЕРАТУРА, 150 °
С; МЕТАН ДАВЛЕНИЯ, 1 x 10⁻³ ММ; РГТВА ДАВЛЕНИЯ, 1 x 10⁻⁵ ММ)

Медленно увеличить скорость потока аммиака в источник ионов при наблюдении интенсивностей ионов при m/z 18 и 35. Поскольку скорость потока аммиака увеличивается, интенсивность пика m/z 18 (NH_4^+) должен сначала увеличиваться, а затем достигают плато, и в этот момент пика при m/z 35 ($NH_3 \cdot NH_4^+$) будут появляться и начинают возрастать по интенсивности. Оптимальная скорость потока аммиака является точкой, при которой пик m/z 18 достигает максимума, а пик m/z 35 только начинает расти в высоту. В этот момент ионы реагента метана газа будут полностью подавляться. Общее давление газа-реагента в ионной chamber бер должно находиться в диапазоне от 0,3 до $1,0 \times 10^{-3}$ мм.

Если разделитель используется, это может быть необходимо, чтобы кровь в метане вместе с аммиачным, чтобы достичь этого общего давления. На фиг.4 показан пример ионов газа-реагента, наблюдаемых при использовании метана в качестве газа-носителя и аммиак вводят в источник ионов, как описано.

Установка газового хроматографа и источник ионов масс-спектрометра орег живать параметры на те, которые будут использоваться для анализа, чтобы быть прове- сформировано. Вводят в системы GX / MS раствора, содержащего специаль- количество сific из, анализируемого вещества, которое является достаточным, чтобы получить хороший спектр Обученные ти масс. (Как правило, от 100 до 200 нг достаточно для этой цели, и поэтому его удобно вводить 1 или 2 μ l от 0,1 мг / мл стандартного раствора, предусмотренного в каждом из анализа наркотиков экспериментальных процедур). Повторно сканировать диапазон масс от 50 дальтона выше протонированной молекула иона аналита. Сравните размер и форму пика анализируемого вещества в общем ионного тока хроматограмме с аналогичными данными, полученными ранее, в или- дер, чтобы определить, имело место существенное изменение в чувствительность или разрешения газовой хроматографии. Также,

В качестве последней проверки GX производительности / MS, настроить систему для мониторинга selected ионов и вводит стандартный раствор, содержащее количество анализируемого вещества, близкого до самого низкого уровня анализируемого вещества, что анализ должен быть способен измерять. изготав- аль Инструмента оператора должен дать указания относительно выбранного иона контроля пара- метров, что обеспечит самое высокое отношение сигнал-шум и лучший динамический диапазон. Как правило, система будет последовательно образец ионного тока, при каждой массе, подлежащих мониторингу, в течение 100 мс промежутки времени. Это имеет важное значение, конечно, что ионные токи быть ментально измеряемым в точном центре каждого из контролируемых ионных масс.

Если пик аналита сигнал, полученный из выбранного анализа мониторинга ионов стандартного раствора является достаточно сильным по отношению к уровню фонового шума, чтобы обеспечить достаточно точное изме- рений высоты пика (т.е. сигнал-шум-отношение, по крайней мере, 3: 1), приступить к анализу биологических экстрактов.

Поскольку основные целью проведения вышеописанного инструмента проверки, чтобы оценить текущую производительность системы, чрезвычайно полезно вести учет данных из этого оцени- ations. Возможность сравнивать текущие показатели с данными усво- ены ранее при одинаковых условиях эксперимента будет большим подспорьем в определении вероятных причин каких-либо изменений, которые могут произойти в исполнении прибора.

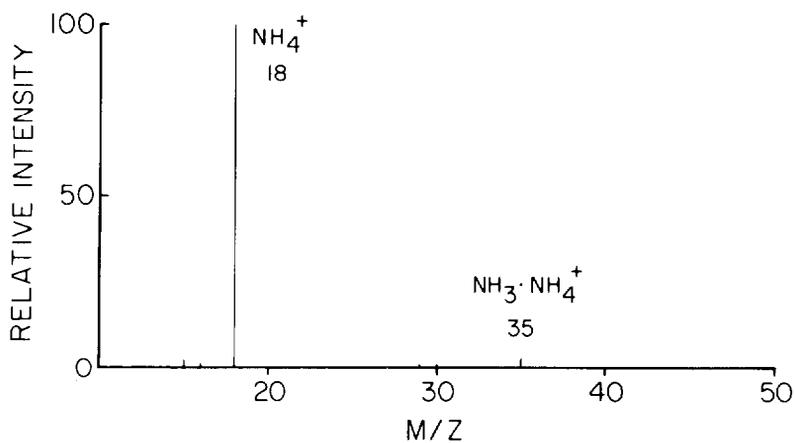


Рисунок 4. метано-АММИАК газ-реагент ИОНЫ (Источник ионы
ТЕМПЕРАТУРА, 150 ° С; АММИАКА ДАВЛЕНИЯ, 2×10^{-4} ММ; МЕТАН
ДАВЛЕНИЯ, 8×10^{-4} ММ)

Общей причиной плохой чувствительности в ГХ / МС анализов является адсорбционной потери анализируемого вещества в колонку для ГХ. Часто чувствительность улучшается после 3 числа инъекций анализируемого вещества раствора. «Prim- ING» ГХ столбцов таким образом, является обычной практикой в газовой хроматографии. Эффект затравки наиболее заметен, когда колонна была ранее. используется для анализа химически различных соединений. В идеале отдельный столбец должен быть зарезервирован для каждой из диффе- препаратов ferent обычно проанализированных. Если это не практично, столбцы используются для количественного определения основных соединений должны, по крайней мере, не являются взаимозаменяемыми с используемыми для анализа кислотных соединений.

Присуща опасность в колонке затравке является то, что некоторые из адсорбированного аналита может быть «смывается» колонка во время последующих инъекций, что приводит к ошибочно высокому значению для концентрации анализируемого вещества, измеренной. Этот потенциальный источник ошибок можно легко проверить путем анализа образца пустого (т.е. экстракта ДОГОВОРА жидкости организма Taining внутреннего стандарта, но ни один из анализируемого вещества) до быть- анализа хлопзавода проб неизвестных.

Контроль качества и источники ошибок

В дополнении к определению, что общий ГХ / МС производительность системы является удовлетворительной, прежде чем начинать анализ проб неизвестных, важно перемежать шипы стандарты среди образцов неизвестных, так что внутри-дневные изменения характеристик прибора будут очевидны и документировано. Контрольные карты являются эффективными средствами вытеснена непрерывная запись точности испытываемой при каждом анализе лекарственного средства (12,13).

Вероятно, самый большой источник ошибок в ОМ / МСЕ анализах количественного наркотиков является то, что участвует в подготовке стандартных решений, используемых при установлении калибровочных графиков (5). После того, как внутренний стандарт добавляется в жидкость организма и становится уравновешенным, есть несколько вещей, которые изменят соотношение веса препарата с его стабильным изотопом меченого аналога.

Неполное уравновешивание внутреннего стандарта в жидкости организма является потенциальной причиной плохой точности. К сожалению, время и условия, необходимые для внутренних стандартов для достижения полного уравновешивания с точки зрения связывания с белками, трудно опре- делить и, несомненно, различны для каждого препарата и типа образца. Процедуры анализа в этой монографии указать уравновешивание в течение 15 мин до начала добычи, но у нас нет никаких убедительных данных, на которых основывать эту рекомендацию. Другие обычно позволяют до тех пор, как 12 ч для уравновешивания (5).

Несмотря на высокой специфичности выбранного иона мониторинга тех- Nique, в частности, при использовании химической ионизации аммиака, ионы из эндогенных соединений будут иногда вмешиваться. Обычно визуальный осмотр ионного тока участков профиля будет указывать, когда аналит или пика внутреннего стандарта содержит вклад другого соединения; то есть, ширина пика будет шире, чем

нормальное или его сохранение время будет немного изменено. Тем не менее, мы уже видели несколько редких случаев, когда эндогенное соединение имело одинаковое время удерживания и получает ионы в той же массе, либо анализируемое вещества или внутренний стандарт. Когда возникает такая ситуация может легко остаться незамеченными и в результате ошибочных данных.

Экспериментальные процедуры могут быть изменены несколькими способами, если необычно высокая степень специфичности требуется. Так, например, / МС ГХ-анализ может быть повторен с использованием колонки ГХ с дифрактометре жидкой фазы ferent полярности, или стакан капиллярной колонки с высоким разрешением может быть использована. Кроме того, ионы видимого фрагмента можно контролировать в дополнении к ионам протонированной молекулы. Это может потребовать ала teration условий ионизации, таких как замещение метана для аммиака в качестве газа-реагента ДИ.

В заключение этой главы, уместно еще раз подчеркнуть замечательную универсальность газовый хроматограф / масс-спектрометра в качестве аналитического инструмента. Опытный аналитик осознает весь спектр возможностей, доступных и может выбрать для изменения процедуры для того, чтобы наилучшим образом удовлетворить конкретные аналитические потребности.

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. RL Фольц, DA Knowlton, ДВК Лин, А. Ф. Фентимэн, младший Труды Второй Международной конференции по изотопам Стабильно, Oak Brook, IL, 20-23 октября, 1975. _____
2. А. Ф. Фентимэн, младший и RL Фольц. J. меченых соединений, _____
13, 579 (1977).
3. А. Ф. Фентимэн, младший и RL Фольц. _____
J. меченых соединений, _____
12, 69 (1976).
4. Личное общение с доктором Фредом Falkner, Pfizer, Центральный научно-исследовательский, Гротон, штат Коннектикут.
5. ВJ Миллард. Количественный масс-спектрометрия. Хейден. Лондон (1978).
6. MG Lee и ВJ Миллард. Biomed. Масс-Спектр., 2, 78 (1975). _____
7. Б. Самуэльсон, М. Хамберг, и СС Sweeley. Анальный. Biochem. , _____
38, 301 (1970).
8. Р. Атман. Biomed. Масс Spectr., 6, 315 (1979). _____
9. М. Claeys, ИП Марков и В. Maenhaut. Biomed. Масс Spectr., _____
4, 122 (1977).
10. DC Фенимор, CM Davis, JH Уитфорд, и СА Харрингтон. Анальный. Chem., 48, 2289 (1976).

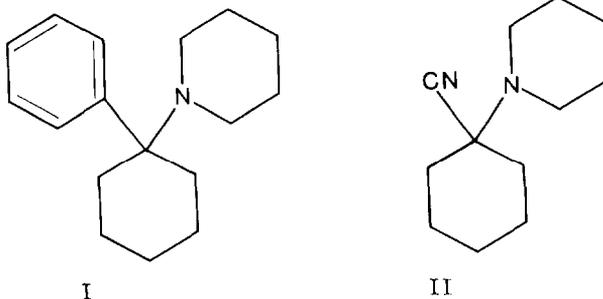
11. RR Watts, изд. Анализ остатков пестицидов в человеке и окружающей среды образцов. Агентство по охране окружающей среды США, воздействие на здоровье научно-исследовательская лаборатория, Отдел экологической токсикологии, Research Triangle Park, NC, Раздел 3, стр. 1-6 (1980).

12. DL Массарт, А. Дейкстра, и Л. Кауфман, ред. Оценка и оптимизация лабораторных методов и аналитических процедур. Elsevier, Amsterdam (1978).

13. ХК Курциус и М. Рот, ред клинической биохимии, принци- Ples и методы. Вальтер де Gruyter, Нью-Йорк, Нью-Йорк, 1, стр. 594- 617 (1974).

Фенциклидин (PCP)

Phencyclidine (PCP), 1-(1-фенилциклогексил) пиперидин (Я был первоначально разработан в 1950-х годах и на рынке в 1963 году, как Sernyl, хирургической анестезии. Однако клиническое применение человека вскоре ОТСОЕДИНЯТЬ продолжались из-за странные побочные эффекты, в частности, пост- анестетики бреды. К 1967 году препарат был коммерчески доступен для ветеринарного использования только (1).



PCP появился как незаконный оборот наркотики улицы в 1967 году, но в течение года он попал в немилость в культуре наркотиков, предположительно, из-за его неприятные последствия.

Несмотря на ранний отрицательный res-

Понс, улица использование восстановила импульс и 1976 PCP был четвертым наиболее распространенной причиной госпитализации по поводу злоупотребления наркотиками в Сан-фран- сий (2) и основной причиной стационарных психиатрических admis- сий в Вашингтоне, округ Колумбия (3). До недавнего времени PCP продаются на улице не было редко представлено правильно; либо он был замаскирован эзотерическое имя или преднамеренно неправильно представлен как THС, мескалин, псилоцибин, или какой-то другой популярной галлюциноген.

Это часто смешивают с другими лекарственными средствами, такими как ЛСД или амфетамин, и появляется в различных физических формах, включая порошковым, капсулы, таблетки, или жидкости, распыляемой на листьях растений. Админи- istration среди пользователей является курение, назальной ингаляции или перорального приема внутрь (3).

«Улица» PCP как правило, не отвлекается от le- gitimate ветеринарных источников, но синтезируются незаконно из легкодоступных химических веществ (5). Промежуточный продукт в синтезе, 1-piperidinocyclohexane карбонитрила (II), является чрезвычайно токсичным и трудно удалить из конечного продукта.

Его присутствие в загрязнитель в несовершенном синтезированном PCP участвует в случаях комы и смерти после приема внутрь PCP (6,7).

ФАРМАКОЛОГИЯ

Фармакология РСР является зависимой от дозы и сложным. Препарат действует главным образом на центральную нервную систему в качестве депрессанта, но таким образом, резко отличается от того из седативно-гипнотического класса депрессантов. Исследования на крысах показали, что это является мощным конкурентным ингибитором захвата катехоламинов в обоих dopamine-ERGIC и норадренергическими областями мозга. Это, в сочетании с его антихолинергическими свойствами, делает РСР необычные и, там-передним, привлекательным веществом для исследования модельных психозов (8). В своих первоначальных хирургических дозах человека (0,25 мг / кг массы тела внутривенно), лечащий врач был найден, чтобы вызвать невосприимчивость и анестезии. Приводятся полные, хотя пациенты, казалось, что он будит. Артериальное давление повышено. При внутривенных дозах 0,5-1 мг / кг, появились агитация и судорожная активность. После даже небольших устных «уличной» доз (обычно 1-6 мг), первоначальное «высокого», в течение которого субъект не отвечает на запросах, но запутаться и взбалтывал, следует депрессиями, раздражительностью, чувство изоляции, а иногда и паранойей. Дозы 10-20 мг, можно даже пути курения, являются достаточными на индуцируют ступор или комы, и большие количества возможных с пероральным приемом могут ускорить фатальные эпилептические припадки и гипертонические кризы. Концентрации в крови РСР как низко как 0,10 мкг / мл были связаны с поведенческими эффектами, приводящих к травмам или гибели, а концентрации выше 1,0 мкг / мл вызывают комы у большинства людей. Концентрации в крови свыше 2,0-2,5 мкг / мл, как правило, со смертельным исходом (9). Восстановление от сублетальных доз обычно происходит в течение нескольких часов, когда препарат был копынными или ингаляционными, но пероральный прием характеризуются восстановительным периодом нескольких дней или недель (2). Было высказано предположение, что эти длительные последствия могут быть из-за липофильную природу РСР; у крыс были обнаружены высокие концентрации, препарата в жировой ткани вскоре после ее появления дис-из плазмы и мочи (10). Кроме того, анализ крови и ткани образцов из фенциклидин, связанных со смертельным исходом показали, что во всех случаях концентрации в тканях значительно превышали таковые в крови, и уровни в крови были аналогичны тем, которые содержатся в плазме от случайных пользователей (11). Поэтому, так как РСР концентрируется в ткани, концентрации в плазме могут не адекватно отражает тяжесть приема. у крыс были обнаружены высокие концентрации, препарата в жировой ткани вскоре после ее появления дис-из плазмы и мочи (10). Кроме того, анализ крови и ткани образцов из фенциклидин, связанных со смертельным исходом показали, что во всех случаях концентрации в тканях значительно превышали таковые в крови, и уровни в крови были аналогичны тем, которые содержатся в плазме от случайных пользователей (11). Поэтому, так как РСР концентрируется в ткани, концентрации в плазме могут не адекватно отражает тяжесть приема. у крыс были обнаружены высокие концентрации, препарата в жировой ткани вскоре после ее появления дис-из плазмы и мочи (10). Кроме того, анализ крови и ткани образцов из фенциклидин, связанных со смертельным исходом показали, что во всех случаях концентрации в тканях значительно превышали таковые в крови, и уровни в крови были аналогичны тем, которые содержатся в плазме от случайных пользователей (11). Поэтому, так как РСР концентрируется в ткани, концентрации в плазме могут не адекватно отражает тяжесть приема.

Шизофренический психоз, в отличие от короткого крачек опьянения, может сохраняться в течение нескольких недель после использования РСР, и, как представляется, связаны с личностными факторами и / или индивидуального препарата чувствительности. Препарат был найден тератогенным (12). В то время как смертность в результате истинных фармакологического передозировки РСР были повторно перенесены, и во многих других случаях, смерть в результате поведенческой токсичности препарата; то есть, случайное утопление или насилие спровоцировало агрессивным behavior (13). Клинически значимые взаимодействия РСР с другими лекарственными средствами злоупотреблений были предложены экспериментами на животных. Так, например, у обезьян РСР сильно потенцировалось эффекты фенобарбитала, в то числе угнетения дыхания. РСР также было установлено, чтобы укрепить наркотиков самоуправления и обезьян, единственный галлюциноген, который, как известно, сделать это, и некоторые человеческие хронические пользователи сообщают о психологической зависимости и поведенческой толерантности. Однако никаких доказательств физической зависимости не сообщалось ни в человеке или животных (14).

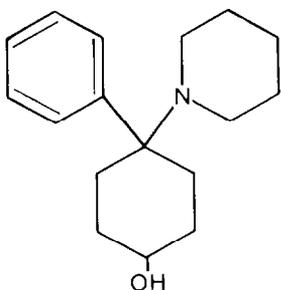
Фармакологии и токсикологии PCP рассматриваются в работах Pu- blished в 1974 году (1,5), а в 1978 году (9). Кроме того, Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотиками монографии рассматриваются многие аспекты злоупотребления PCP, лечение PCP интоксикаций, (16) и фармакология препарата

Фармакокинетика и метаболизм

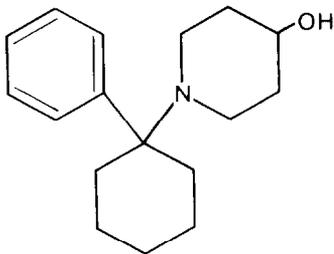
Phencyclidine, с рКа 8,5, по-видимому, быстро метаболизируется и выводится из организма. Около 60 процентов меченого PCP внутривенного введения обезьян появились в моче в течение 12 часов и 75 процентов в течение восьми дней (17). В случае острой интоксикации в организме человека, концентрации мочи были использованы для прогнозирования длительности комы (2). Сравнение плазмы с концентрацией мочевой PCP в «влажности от человека передозировки» случаев, показали, что концентрации в моче были PCP 13-19 раз приуроченных концентрации в плазме крови (18). В Ликвидация полураспада в плазме около 11 часов было сообщено в случае приема внутрь PCP человека (19).

Было показано, однако, что PCP выводится из организма гораздо быстрее, в кислой моче, а также несколько сильно интоксикацией пациентов были успешно лечить с помощью мочи acid- процедур фикации, такие как желудочной инфузии с $\text{NH}_4 \text{Cl}$ (20).

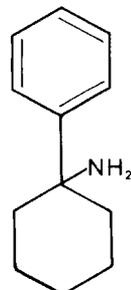
У человека, PCP из организма преимущественно в виде monohydroxylated производных в виде конъюгатов. Два из этих метаболитов, выделенных из мочи человека после ферментативного гидролиза, были идентифицированы с помощью масс-спектрометрии, как 4-фенил-4-piperidinocyclohexanol (III) и 1-(1-фенилциклогексил) -4-гидроксипиперидин (IV), (21). Оба были найдены метаболиты обладают слабой фармакологической активностью у испытуемых животных (22)



III



IV



V

Следы N-деалкилируют метаболита, 1-phenylcyclohexylamine (V), также были обнаружены в моче PCP-состоянии алкогольного опьянения пациента (23). Дигидрокси метаболиты образуются у крыс, мышей, голубей, овец и обезьян, и у этих животных PCP имеет тенденцию быть менее токсичными, чем у видов, которые имеют более слабую способность к гидроксильрованию (24). В тестах на обезьянах, не метаболитов были обнаружены в центральной или периферической ткани, хотя неизменной PCP присутствовал в седалищного нерва, спинного мозга и головного мозга (17). Обнаружение PCP метаболизируемые Lites в крови человека не сообщалось.

АНАЛИТИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА

Как правило, моча пациентов видна на чрезвычайно высокой основе шейся достаточно высокую концентрацию неразложившихся РСР (> 0,2 мг / мл), чтобы разрешить качественное обнаружение с помощью любого из различных аналитических методов (25). Они включали тонкослойная chromatography (ТСХ), с чувствительностью 0,2 мг / мл (26) и газа chromatography (GC) с чувствительностью 2,0 мг / мл (27). ГХ в сочетании с масс-спектрометрией (28,29) и ТСХ (30) была использована для идентификации РСР в конфискованных образцах уличных наркотиков. Тем не менее, оба клинические работы и фармакокинетические исследования было затруднено из-за отсутствия надежных количественных методов анализа РСР в биологических жидкостях. Hoffmann-La Roche продает радиоиммуноанализ (РИА) набор для РСРА и Сува этого поля тестирования однородных иммуноферментного анализа (испускает) для лекарственного средства. На сегодняшний день, однако, чувствительность и специфичности этих анализов не были опубликованы. Недавно сообщалось, способ с использованием ультрафиолетовой спектроскопии, который был в состоянии измерить концентрацию РСР в экстрактах мочи кон- Taining как мало, как 0,01 мг препарата по сравнению с стандарт оптической плотности кривых. Однако, когда другие базовые препараты были предварительно отправлены в образце, был использован ГИ анализ с пламенно-ионизационным детектором (FID). Метадон был выбран в качестве внутреннего стандарта. Система ОГО-ПИД (хромосорбе Вт с покрытием Arjepzon L, колонок температура 200°C) обнаружен 0,076 мг / мл РСР добавлена в мочу, а также ментальна измеряемый диапазон 0.1-69.4 мг / мл препарата в образцах из HOS - Pital входных плат (31), который был в состоянии измерить концентрацию РСР в экстрактах мочи кон- Taining как мало, как 0,01 мг препарата по сравнению с стандарт оптической плотности кривых. Однако, когда другие базовые препараты были предварительно отправлены в образце, был использован ГИ анализ с пламенно-ионизационным детектором (FID). Метадон был выбран в качестве внутреннего стандарта. Система ОГО-ПИД (хромосорбе Вт с покрытием Arjepzon L, колонок температура 200°C) обнаружен 0,076 мг / мл РСР добавлена в мочу, а также ментальна измеряемый диапазон 0.1-69.4 мг / мл препарата в образцах из HOS - Pital входных плат (31), который был в состоянии измерить концентрацию РСР в экстрактах мочи кон- Taining как мало, как 0,01 мг препарата по сравнению с стандарт оптической плотности кривых. Однако, когда другие базовые препараты были предварительно отправлены в образце, был использован ГИ анализ с пламенно-ионизационным детектором (FID). Метадон был выбран в качестве внутреннего стандарта. Система ОГО-ПИД (хромосорбе Вт с покрытием Arjepzon L, колонок температура 200°C) обнаружен 0,076 мг / мл РСР добавлена в мочу, а также ментальна измеряемый диапазон 0.1-69.4 мг / мл препарата в образцах из HOS - Pital входных плат (31).

Для быстрого анализа мочи на РСР в клинических условиях, температура были предложены р запрограммированных (150- 230 °) ГИ-ПИД на колонке 5 процентов SE-30 плюс 1 процент Carbowax 20Y на Chromosorb WHP. Метаболиты, 1-

(1-фенилциклопексил) -4-hydroxypiperidine (IV),

является

Также наблюдаемая с помощью этой техники, чтобы подтвердить наличие РСР даже тогда, когда препарат был широко метаболизируется (32).

Способ ОГО-ПИД использование merivacaine в качестве внутреннего стандарта и OV-17 или OV-17 колонки при 180 ° С, был применен к крови и ткани образцов на, а также к моче. Концентрации в крови в смертельных случаях от передозировки в диапазоне от 0,5 до 5,0 мг / мл, а в ткани печени из одних и тех же лиц, от 5,0 до 36,0 мг / г (33). Концентрации в плазме человека РСР в клинических случаях, которые охватывали диапазон 0.09-

0,22 мг / мл, были измерены с помощью аналогичной методики ГХ-FID (3,8 процента пер- УСС-98 по газу Chrom Q при температуре 200 ° С Температура колонки) с использованием кетамина в качестве внутреннего стандарта (19).

Повышенная чувствительность и

Селективность были достигнуты в методе ГХ с использованием детектора азот- фосфора (3 процента OV-17, 165 ° С изотермического). Мереги- обедает был использован в качестве внутреннего стандарта из-за своего химического сходства с лечащим врачом. Метод дал линейную калибровочную кривую до 1 мг / мл и может обнаружить лишь 10 нг / мл в плазме РСР (11).

Комбинация ОГО и МС с выбранным мониторингом ионов и использованием меченого изотопом варианта в качестве внутреннего стандарта была применена к количественному РСР в крови и моче.

поскольку

первоначальный доклад адаптации ГХ / МС анализа к РСР

(21), этот метод был применен к изучению концентрации в крови в 26 РСР интоксикаций, где концентрации варьировались от 0,007 до 0,250 мкг / мл (34), а также исследования серийных плазмы и мочи в попытке соотнести концентрации РСР с длительностью психотропных эффектов (20). ГХ / МС анализ РСР также была адаптирована к автоматизированной процедуры с использованием согласования на основе вероятности, в компьютеризированной системы GC / MS (OLfax) с использованием алгоритма обратного поиска для измерения уровней РСР в моче. Метод позволяет анализировать до восьми проб в час и имеет предел обнаружения приблизительно 10 нг / мл РСР (35).

Для получения количественных исследований РСР, важно отметить, что phencyclidine претерпевает прогрессивное термическое разложение 1-phenylcyclohexane, как температура поднимется выше 150 ° C. Для того, чтобы свести к минимуму во время пиролиза газа chromatography, температура впрыска порт должен быть ниже 200 ° C (21,25,36).

Растворители, которые были использованы для извлечения РСР из алка- линии биологических жидкостей включают гексан, с общим восстановлением 70-85; проценты (21); циклогексан, 95 процентов (используется только для мочи) (35); петролейный эфир, 76 процентов из плазмы (19); диэтиловый эфир (34); 1-хлорбутан (33); 95 процентов этанола (для ТСХ мочи) (30); и хлороформ, только моча, с 83-процентным восстановлением повторно портированы (27,31).

Повышение pH мочи до 9 сообщениям позволяет восстановление РСР и количественного восстановления пуфоху метаболита с хлороформом (32) 94 процентов. Извлечение из мочи с помощью процедуры смолы с обращенной фазой XAD-2, с количественным восстановлением) РСР и 89 процентов метаболита, также сообщалось. Назад: извлечение в водный раствор кислоты часто используется для того, чтобы разделяющимися ели РСР из нейтральных и кислых материалов, с последующим realkalini- зации и рекстракции с органическим растворителем.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОЦЕДУРА

Поскольку фенциклидин может быть психоактивным при низких концентрациях в крови ГХ / МС аналитическая процедура предназначена для измерения препарата в плазме концентрациях ниже 1 нг / мл. Процедура экстракции состоит из добавления дейтерий-меченных фенциклидин и pH 9,6 буфера в плазме, с последующей экстракцией гексаном, обратной экстракции в кислоте, и, наконец, подщелачивание и рекстракции с гексаном. Химическая ионизация метана и аммиака в качестве газообразных реагентов используется для анализа ГХ / МС.

Стандарты и реагенты

Phencyclidine гидрохлорид был приобретен у Applied Science Laboratories, State College, PA 16801. **Phencyclidine-2 ЧАС₅(1- [1-(фенил- 2 ЧАС₅ циклогексил] пиперидин) синтезируют из bromoben- zene-2 ЧАС₅ по опубликованной методике (38).** Было установлено, что 99 процентов чистой на основе анализа ГХ / МС. Более 99 процентов молекул содержали пять атомов дейтерия и менее чем 0,1 процента молекул были нейдетерированные.

Подходящий pH 9,6 буфер может быть получен путем растворения 500 грамм моногидроортофосфата фосфата калия ($K_2 HPO_4$) примерно в 500 мл дистиллированной воды. Когда вся соль растворится, дают раствору остыть до комнатной температуры и добавить достаточное количество воды, чтобы дать ровно 1 литр.

Маточные растворы фенциклидина и phencyclidine-2 ЧАС₅, используется для определения калибровочных графиков (глава 2) и под-готовке рабочих стандартов, получают следующим образом. Взвешивание в 100-мл мерную колбу 11,5 мг гидрохлорида фенциклидин или 10 мг свободного основания. Растворить препарат в метаноле и довести объем до 100 мл ровно с дополнительным количеством метанола. Описывать возникающую исходный раствор будет соответствовать концентрации 0,10 мг / мл фенциклидин в расчете на свободное основание. Серия рабочих стандартных растворов затем могут быть получены путем соответствующего разбавления исходного раствора, как описано в главе 2. Исходный раствор **phencyclidine-2 ЧАС₅ получают таким же образом. Для измерения фенциклидинов в жидкостях организма в диапазоне концентраций от 1 до 1000 нг / мл, добавление приближено 40 нг внутреннего стандарта на каждые мл образца является удовлетворительным. Это может быть удобно сделать путем добавления 100 μ л из 400-нг / мл phencyclidine-2 ЧАС₅ метанольный раствор на каждый мл образца. Подготовьте / мл стандартного раствора БВ 400 нг разбавление 1 мл 0,10 мг / мл исходного раствора phencyclidine-2 ЧАС₅ до 250 мл метанола. Хранить запас и рабочие стандартные растворы в хорошо закупоренных или блокированных стеклянных сосудах при охлаждении.**

экстракция

Передача 1 мл образца (цельной крови, плазмы, мочи или спинномозговой жидкости) к 20-мл пробирку, снабженную тефлоновой футеровкой винтовой крышкой (от 0,5 до 2 мл образца может быть использован, но он должен быть МЕА - ренные точно). **Добавьте 100 μ л из 400 нг / мл phencyclidine-2 ЧАС₅**

раствор внутреннего стандарта в жидкости тела и вихря в течение 10 сек. Разрешить образец для уравнивания в течение примерно 15 мин и затем добавляют 1 мл буфера pH 9,6 и 5 мл гексана. Закрывают трубку и проверьте утечки вокруг крышки. Аккуратно перемешать содержимое в течение 30 мин с использованием моторизованной качалки или ротатора. Центрифуга в течение 5 мин, а затем передать органический слой (вверху) на чистую пробирку с помощью одноразовой пипетки Пастера. Добавляют 5 мл 0,2 NH₂ TAK₄ и **vig- oously перемешивать в течение примерно 1 мин. Удаляют гексан слой (вверху). Добавьте** достаточное количество 1 N NaOH к водному слою, чтобы повысить pH до 9,5. Добавляют 5 мл гексана и снова перемешивать энергично в течение приблизительно 1 мин. Центрифуга и передать органический слой (верхний) к силилированному концентрату по крайней мере, 5 мл по объему и имеющему конический или ниппель-образной форме дна. Добавьте 20 μ л диметил- формамида как «хранитель» растворитель для минимизации испарительной потери фенциклидина. Удалите гексан выпариванием при генера- ОДВТА токе азота или отфильтрованного воздухе при нагревании при температуре от 40 до 50 ° C. Когда объем экстракта уменьшилось до приблизительно 20 μ л, закрывают пробирку или покрывают верхнюю часть с парафином и хранить при температуре 0 ° C до тех пор / МС ГХ-анализ не должен быть выполнен.

Immediately до анализа,

позволяют трубке нагреться до комнатной температуры.

ГХ / МС анализ

Следующие экспериментальные условия являются удовлетворительными для ГХ / МС анализа фенциклидин:

ГХ колонка: 1,8 м x колонка 2 мм (ID), стекла упакованы с 3 процента OV-1 на 100/120 меш Газ Chrom Q (Прикладные науки Лаборатория, State College, PA 16801)

Газ-носитель: Метан, 15-20 мл / мин

Температура: Инжектор, 200 ° C Колонка, 180 ° C
изотермического ГХ / МС переноса линия,
200 ° C Источник ионов, 160 ° C

В этих условиях фенциклидина и phencyclidine-2 ЧАС₅

должны элюировать около 3 мин в виде узких, симметричных пиков.

перед началом ГХ / МС анализ образцов, производительность общей системы ГХ / МС должна быть оценена и оптимизирована, как описано в главе 2. Ионы, которые будут происходить при отслеживаемые м / з 244 и **249. Они соответствуют протонированной молекулы ионы для фенциклидин и phencyclidine-2 ЧАС₅, соответственно.** С отбракованных клапана в положении отбракованных, вводят от 2 до 6 мкл гексана экс-кишечного тракта в газовый хроматограф. Примерно через 1 мин, переключить отбракованный клапан таким образом, что весь поток газа-носителя поступает в источнике ионов масс-спектрометре, и начинают сбор данных. Когда пики фенциклидина были элюировало, прекращает сбор данных и вернуть отбракованный клапан в положение отбракованного. Количество фенциклидина в образце плазмы определяется путем измерения высоты (или **зоны) на фенциклидин и suclidine-ского явления₂ ЧАС₅ Пики в текущих профилях выбраны ионных («ионные хроматограммы»)** и соответствующие соотношения высот пиков на графике calibra- ции. Вычислить концентрацию фенциклидина в образце пути деления измеренного количества фенциклидина точного объемом образец, используем в анализе.

Обсуждение процедуры экспериментальной

Во время экстракции фенциклидина из биологических жидкостей, основное лекарственное средство может быть отделено от нейтральных и кислых материалов с помощью задней методики экстракции. Биологический образец изготовлен алка- линию и экстрагируют с помощью органического растворителя; фенциклидин затем снова экстрагируют из органического растворителя с водной кислотой. Однако, если хлороформ или метилхлорид, используют в качестве органического растворителя в этом стадии и разбавленные соляную кислоту используется для обратной экстракции, большая часть фенциклидина будет оставаться в органической фазе вместе с нейтральными компонентами. Про- избегают я проблема с использованием гексана в качестве органического растворителя и разбавленной серной кислоты для обратной экстракции. Экстракт водная кислота затем подщелачивают и снова экстрагируют гексаном. С помощью этой комбинации реагентов,

от 70 до 85 процентов.

Во время ранней работы с фенциклидин, было замечено, что GC Ана-yses препарата, как правило, показал второй пик значительно элюированный до фенциклидин. Второй пик был идентифицирован как 1-фенил- циклогексена на основе его масс-спектра и сравнения с аутентичным материалом (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI). 1-фенил- циклогексена является продуктом термического разложения фенциклидина. Следовательно, когда фенциклидин является газовой хроматографии, размер пика 1-phenylcyclohexene зависит от температуры впрыска порта. На рисунок 1 показан пламенно-ионизационный детектор, который Запись- Ings в результате газовой хроматографии фенциклидина с температурой инъекционного порта 300, 250 и 200 ° C. 1-фенил- циклогексена пика уменьшилась в размере, как инъекционный порт был снижен температура. При температуре впрыска порта 200 ° C пик 1-phenylcyclohexene составил лишь 0,5 процента от пика cycloidine сикс явления высоты. При температуре впрыска порта 150 ° C пик 1-phenylcyclohexene все еще обнаруживается, но теперь повторно представлен лишь 0,1 процента от пика фенциклидина высоты. Ввиду тепловой лабильности фенциклидина, важно, чтобы все поверхности, которые могут вступать в контакт с лекарственным средством при самой низкой практической температуре. Например, если ГХ / МС сепаратор нагревают до 280 ° C некоторыми из фенциклидин, элюируемой из колонки газового хроматографа будет термически превращают в 1-фенил- циклогексена. но теперь повторно представлен лишь 0,1 процента от пика фенциклидина высоты. Ввиду тепловой лабильности фенциклидина, важно, чтобы все поверхности, которые могут вступать в контакт с лекарственным средством при самой низкой практической температуре. Например, если ГХ / МС сепаратор нагревают до 280 ° C некоторыми из фенциклидин, элюируемой из колонки газового хроматографа будет термически превращают в 1-фенил- циклогексена. но теперь повторно представлен лишь 0,1 процента от пика фенциклидина высоты. Ввиду тепловой лабильности фенциклидина, важно, чтобы все поверхности, которые могут вступать в контакт с лекарственным средством при самой низкой практической температуре. Например, если ГХ / МС сепаратор нагревают до 280 ° C некоторыми из фенциклидин, элюируемой из колонки газового хроматографа будет термически превращают в 1-фенил- циклогексена.

Электронным ударом (EI), метан химической ионизации (СIСН₄), и метан-аммиак, химическая ионизация (СIСН₄- Нью-Гемпшир з) масс-спектры фенциклидина показаны на рисунке 2. ЭИ спектр фенциклидин (вверху) обильный снег иона при м / з 200 в результате потери С з ЧАС₇ из циклогексила кольца. Так как атомы дейтерия в внутреннего стандарта находятся на ароматическом кольце, соответствующий ион в масс-спектре дейтерированного фенциклидин смещается в сторону т / г 205; Таким образом, ионы при м / з 200 и 205 являются удовлетворительными для выбранного мониторинга ионов.

В масс-спектре СI метана

(Средний), М + является более интенсивным, чем МН +, предполагая, что перенос заряда эффективно конкурирует с переносом протона, когда мет- АНЭ используют в качестве газа-реагента. В масс-спектре ДИ метан-аммиак (внизу) ионы протонированной молекулы дают наиболее интенсивных пика и фрагментации практически отсутствует. Относительный РЕМОНТ sponses для известных ионов в различных режимах ионизации сравнивается в таблице 1. Значения в последнем столбце таблицы 1 показывают, что лучшая чувствительность достигается со смесью метана и аммиака в качестве газа-реагента. Эти данные были получены в двух отдельных Финнигэн 3200 ГХ / МС систем, один оптимизированных для EI, а другой для CI.

Если максимальная чувствительность важна каждая

Способ ионизации должны быть оценены на конкретной системы ГХ / МС (ы), которые будут использоваться для анализа. Чувствительность может значительно отличаться от прибора к прибору.

Для оценки воспроизводимости методы, пяти независимых анализов повторностей были проведены на 1-мл образцов цельной крови, содержащих 100 нг фенциклидина и 50 нг внутреннего стан- Dard. Метан был использован в качестве газа-реагента и контролировали ионы при м / з 159 и 164, а на т / г 243 и 248. Относительные стандартные отклонения для коэффициентов высоты пиков были 2,9 и 2,3, соответственно.

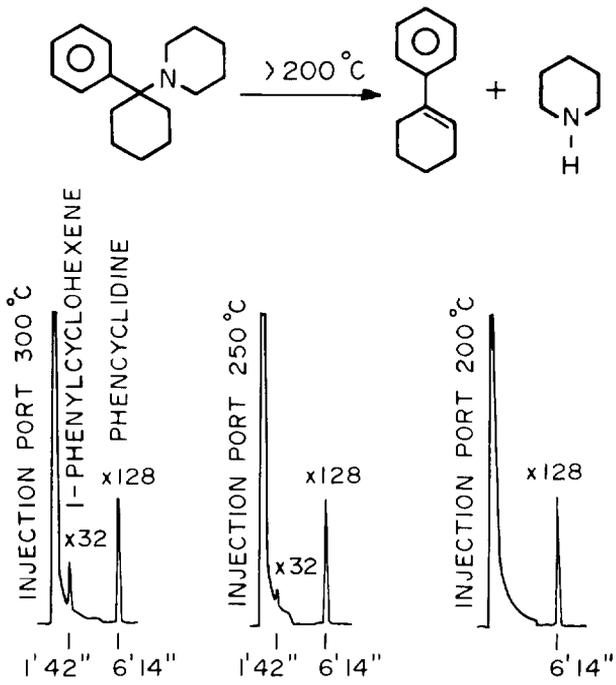


Рисунок 1. ГАЗА хроматограмм SHOWING ГЕНЕРАЦИЯ 1-PHENYLCYCLOHEXENE ОТ ВПРЫСКА PHENCYCLIDINE НА ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ инъекционного порта

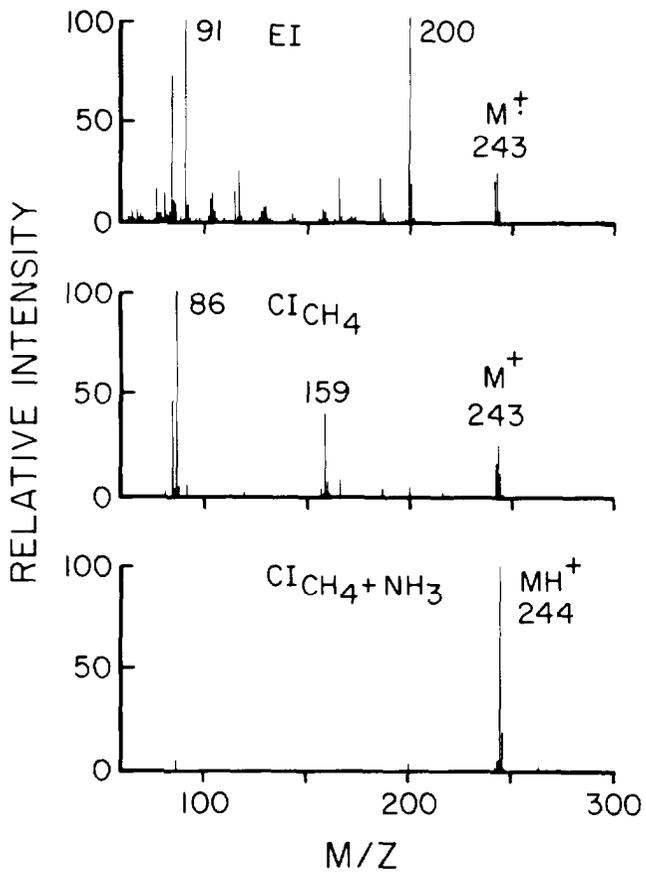


Рисунок 2. Масс-спектры фенциклдин

Таблица 1. Относительная РЕАКЦИЯ ДЛЯ ВЫДАЮЩИХСЯ ИОНОВ В
EI И ДИ Масс-спектры фенциклидин

<u>МЕТОД</u>	<u>м / г Контролируемый</u>	Процент от общей суммы	Относительный ответ
		<u>ИОННЫЙ ТОК</u>	<u>На единицу веса</u> от наркотиков
EI	200 (M + -C з ЧАС 7)	14	59
ДИ (СН 4)	243 (M +)	24	20
ДИ (СН 4 Нью-Гемпшир 3)	244 (MН +)	73	100

Концентрации В таблице 2 перечислены фенциклидин, найденные в различных жидкостях организма от фенциклидин-состоянии алкогольного опьянения пациентов. Кровеносные концентрации, в диапазоне от 49 нг / мл для ребенка в коме, до 2,7 мкг / мл, найденных у взрослого, который умер после передозировки.

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИИ фенциклидина в биологических жидкостях ИЗ
фенциклидин Intoxicated ПАТЕНТНЫХ

<u>Дело Number</u>	<u>Кровь</u>	<u>Урин е</u>	<u>CSF</u>	<u>Сера м</u>
1 (Adult, со смертельным исходом)	2,7 мкг / мл	-	-	-
2 (Ребенок, кома)	49 нг / мл	910 нг / мл	6,5 нг / мл	-
3 (Молодежи, сонный)	51 нг / мл	870 нг / мл	-	-
4	-	-	-	171 нг / мл
5 б	-	-	-	73 нг / мл

а Состояние пациента было описано как «серьезное».

б Состояние пациента было описано как «довольно серьезно.»

Физические, химические и СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ДАННЫЕ ДЛЯ Phencyclidine

Номенклатура

Химическое название: 1- (1-Phencyclohexyl) пиперидин

Другие имена: фенциклидин, HOG, PCP, CI-395, Angel Dust Эмпирическая формула: C₁₇ H₂₅ N

25 Количество N Chemical Abstracts Registry:

_____ 77-10-1

Торговые названия гидрохлорида: Sernyl, Sernylan

Физические константы

Внешний вид: белые кристаллы

Температура плавления: _____ 46-46.5 ° C; гидрохлорид, 243-244 & deg; C

Точка кипения: _____ 135-137 & deg; C (1,0 мм)

Удельное вращение: Оптический неактивны

Растворимость: гидрохлорид растворим в неацетилене, этанол и хлороформ.

РЕКОМЕНДАЦИИ

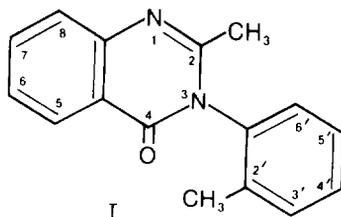
1. Unsigned. PCP (Phencyclidine): Новый Disillusionogen. STASH Press. Madison, WI (1975). _____
2. Unsigned. Аварийный Мед., 8 (3), 265 (1976). _____
3. П. В. Luisada и Б. Браун. Clin. Toxicol., _____ 9 (4), 539 (1976).
4. GD Lundberg, RC Гупта и SH Монтгомери. Clin. Toxicol., 9 (4), 503 (1976). _____
5. AT Snulgin и DE Mac Lean. Clin. Toxicol., 9 (4), 553 (1976). _____
6. С. Helisten и AT Snulgin. J. Chromatog., 117, 232 (1976). _____
7. Д. Ганье и Р. К. Пайк. J. Assoc. Выкл. Анальный. Chem., 60, 32 (1977). _____
8. KE Garey и RG Heath. Life Sciences., 18, 1105 (1976). _____
9. RS Ожоги и SE Лернера. Clin. Toxicol., 12, 463 (1978). _____
10. SH Джеймс и SH Шноль. Clin. Toxicol., _____ 9 (4), 573 (1976).

11. Д. Бейли, РФ Shaw, и JJ Губа. J. Anal. Toxicol., 2, 233 (1978). _____
12. F. Walker. Наука, 184, 189, (1974). _____
13. RS Ожого и SE Лернер. Clin. Toxicol., _____ 9(4), 477 (1976).
14. RL Balster и LD Хаит. Clin. Toxicol., 9 (4), 513 (1976). _____
15. JC Мунка. Bull. Наркотики, 26 (4), 9 (1374). _____
16. RC Петерсна и RC Стиллман, ред Phencyclidine (PCP) Злоупотребляющий. Оценка. Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотических средств Исследовательской монографии 21, DHEW Pub. (ADM) 78-728. Supt. из Docs.,
США правительственные службы. Распечатать. Off Вашингтон, округ Колумбия (август 1978 г.).
17. RE Ober, GW Gwynn, Т. Чанг, Д. Маккарти, и AJ Глазко. Кормили. Proc., 22, пт. 1, 539 (1963). _____
18. EF Domino и AL Wilson. Clin. Pharmacol. Therap., 22, 421 (1977). _____
19. JA Маршман, MP Ramsay и EM продавцов. Toxicol. Appl. Pharmacol., 35, 129 (1976). _____
20. А. ч. Готова, Р. Агопов, JA Miceli и ДВК Lin, в ВН Rumack и AR Temple, ред., Управление отравленного пациента. _____
_____ Science Press, Princeton, NJ, стр. 79 (1977).
21. ДВК Лин, А. Ф. Фентимэн, младший, КЛ Фольц, RD Форни-младший, и я Саншайн. Biomed. Масс-Спектр., 2, 206 (1975). _____
22. EF Domino. Int. Rev. Neurobiol., 6, 303 (1964). _____
23. ЛК Вонг и К. Римана. Biomed. Масс-Спектр., 2, 204 (1975). _____
24. НВ Хакер. Анна. Rev. Pharmacol., 10, 99 (1970). _____
25. СВ Liden, FH Лавджой, младший и СЕ Костелло. J. Amer. Med. Assoc., 234 (5), 513 (1975). _____
26. NC Jain, RD Бадд, WJ Leung и ТС Снит. J. Anal. Toxicol. , 1, 77 (1977). _____
27. Б. Финкл, Е.Ю. вишня, и ДМ Тэйлор. J. Chromatogr. Sci., _____
9, 393 (1971).
28. J.-Е. Линдгрэн, С.-G. Молоток, Р. Hessling и Б. Holmstedt. Am. J. Pharm., 141, 86 (1969). _____
29. RC Шалер, JM Паркер и А. Sage. Clin. Toxicol., 7 (3), 307 (1974). _____
30. JK Браун, Л. Sharazian и Д. Гриффин. J. Chromatogr., _____
64, 129 (1972).

31. RC Гупта, И. Лу, GL. Оэй и GD Lundberg. Clin. Toxicol., 8 (6), 611 (1975). _____
—
32. PM Froehlich и Г. Росс. J. Chromatogr., 137, 135 (1977). _____
33. PC Рейнольдс. Clin. Toxicol., _____ 9 (4), 547 (1976).
34. DS Pearce. Clin. Chem., 22, 1623 (1976). _____
- 3.5. WD Маклеод, младший, DE зеленый, и E. Сит. Clin. Toxicol., 9 (4), 561 (1976). _____
—
36. ЛК Вонг и К. Римана. Clin. Toxicol., 9 (4), 583 (1976). _____
37. A. Kalir, X. Эдери, З. Pelah, Д. Balderman и Г. Порат.
J. Med. Chem., 12, 473 (1969).
38. А. Ф. Фентимэн, младший и RL Фольц. J. меченых соединений и
Радиофармпрепараты, 12, 69 (1976). _____

Метаквалон

Метаквалон (2-метил-3-о-толил-4 (3Н) -хиназолинон, I), был впервые синтезирован в 1951 году после выяснения структуры febrifugine, активный принцип древнего китайского противомаларийного чана Shan, стимулировал интерес к медицинской химии производного хиназолина (1).



Он был введен в Европе в 1956 году и в США в 1965, рекламируется как nonbarbiturate, привыкания sedative- снотворное, и продаются под несколькими торговыми марками, включая Quaalude, сопор, Optimil, Parest и Somnafac. В течение нескольких лет он стал шестым самым продаваемым седативно-снотворным в этом (2) стране. Злоупотребление Метаквалона быстро следовать, и к 1972 году достиг масштабы эпидемии в Соединенных Штатах, хотя первый случай смертельного отравления был зарегистрирован в Европе по крайней мере, десять лет назад (3).

ФАРМАКОЛОГИЯ

Даже в терапевтических дозах (150-500 мг), метаквалон может производить чувственное, эйфории состояния и спокойное, интимное настроение, которое объясняющая популярность и потенциал злоупотребления. Однако, препарат может накапливаться в крови после повторных доз и вызывает привыкание после длительного использования; резкая отмена может привести к смерти, если не должным образом контролируется. Метаквалон особенно опасно, когда потребляется с алкоголем. Кома и конвульсии могут быть результатом острого приема внутрь 2 г метаквалона и смертей от 8 грамм, но в присутствии спирта этих последствия могут возникнуть в результате приема значительно меньших количеств лекарственного средства (2). поскольку

1973, незаконное использование метаквалон резко сократилось, Так, очевидно из-за жесткого контроля его производства и сети сбыта.

Метаквалон представляет собой производный липофильные, растворимые в кислоте, хиназолины легко получен из анраниловой кислоты, o-toluidine и ацетилирования

тин агентом. Она имеет абсорбционную спектроскопию характеристики ультрафиолетовой спектр автоионизация и является достаточно летучей для газовой хроматографии. Его рKa, кальцит танний от УФ-спектральных данных, составляет 2,5 (4). Несмотря на то, устойчивы к химическому гидролизу или окислению, он быстро гидроксильированный в печени микросомальных ферментов до полярных метаболитов, которые являются экскременты Ted конъюгаты в основном в качестве бета-глюкуроновой кислоты (1). Так как метаболизируемые Lites метаквалона не присутствуют в значительных количествах в крови (<0,2 мкг / мл) после того, как в терапевтических дозах, они, вероятно, сопri- Бьют очень мало общий фармакологический ответ на метаквалон (5). Тем не менее, исследование мочевых узоров метаболита в шести добровольцах с учетом одного или неоднократного терапевтические дозы метаквалона показали более высокий уровень мочевой одного метаболита, 2-метил-3-(2'-гидроксиметилфенил) -4 (3H) -хиназолинон,

в indivi- двойственные которые продемонстрировали наиболее выраженный физиологический ответ (снижение толерантности) к препарату. Так же, метаболит был найден, неконъюгированного, в крови пациентов передозировки, этот ком- фунт может быть фармакологически активным (6).

Фармакокинетика и метаболизм

Связующие исследования по равновесному диализу установили, что 80 процентов administered метаквалона являются белком в плазме в течение всего терапевтического диапазона концентрации. Основываясь на этом наблюдении, и в предположении, что только неконъюгированного мета- qualone является фармакологически активным, сравнение уровней несвязанного препарата в сыворотке с уровнями в цереброспинальной жидкости (CSF) путем измерения газовой хроматографии показал, пассивный, беспрепятственный перенос лекарственного средства к СМЖ. Однако, лекарственные средства, которые конкурируют за про- Tein сайтов связывания теоретически может повлиять на передачу (7). Другие работники также отметили, что восприимчивость phar- тасokinetics метаквалона влияют на другие препараты, особенно лекарства, способные влиять на окисление в печени микросом. Это не только академический интерес,

В связи с этим, изучение кинетика метаквалона в композиции, содержащей 250 мг метаквалон, 300 мг carbromal и 0,33 мг бензацина, нашли уровни в плазме 6-ч метаквалона, чтобы быть ниже, чем те, которые обычно повторно портирована для одного только метаквалона. Эти результаты могут указывать на влияние других препаратов на метаболизме метаквалона, оказывая поддержку утверждения, что фармацевтическая композиция, Staudordorm, искорен Атес метаквалон «похмелье» (8).

Наиболее характерные признаки результатов фармакокинетических исследований метаквалона были значительные различия в скорости поглощения различных предметов и тем быстрее скорость поглощения для соли гидрохлорида, по сравнению со свободным основанием (1). Уровни в плазме метаквалона после однократной пероральной дозы 300 мг дегел- союзника достигает максимум 1-8 мкг / мл в течение 2 ч. Средняя продолжительность жизни плазмы половины сообщалось в 2,6 ч для первого, быстрого экскременты тори фазы (9). Медленно выделительная фаза становится очевидной столько, сколько 100 ч после приема внутрь, а период полураспада этой фазы по-разному сообщается, от 19 до 50 ч (10,11).

Метаквалон метаболизируется в организме человека, так что очень мало неизменные наркотики, как правило, <5 процентов, выводятся из организма с мочой (12).

В самом деле, действие даже малых количеств повторно портирована была поставлена под сомнение недавней идентификацией метаквалон-N-оксид в моче человека предметов, приведенных 250 мг метаквалона. Этот метаболит приходится 5-9 процентов от дозы в 24 ч, и, поскольку она легко подвергается термической конверсии в метаквалон в условиях газовой хроматографии, его присутствие может привести к ошибке высоких вычислений для свободного метаквалона (13).

Метаболические пути, включающие образование дигидрокси и гидроксильных производных метоксите метаквалон существует, но они незначительны в терминах относительных концентраций метаквалона метаболитов в моче. Основной путь для Metаквалона monohydroxylation в печени при любом из десяти возможных мест. Тем не менее, гидроксирование является пол-специфическим в том, что пять из возможных моногидроксипроизводных метаболизируемых Lites преобладают над другими в моче человека; то есть, те, с заменами в положении 3', 4' и 6 позиций и на метиловых групп 2 и 2'-. (14). 3-гидрокси метаболит лишь недавно был подтвержден в моче человека (15). Стиллаулл и сотрудники отожествляются пять dihydrodiol и два hydroxydihydrodiol метаболитов метаквалона в негидролизованной (некоъюгированной) фракции мочи человека влажности от, а также обнаружены несколько неопознанных триолов. Они интерпретируются эти обнаружения в качестве доказательства для метаболизма метаквалона у человека путем эпоксидных промежуточных продукты. Масс-спектры показали, что три из dihydrodiol и оба hydroxydihydrodiols были сформированы путем эпоксидирования в толил кольца, в то время как масс-спектры двух других предложил эпоксидирования ядра хиназолинон. Авторы предположили, что из многих мочевых метаболитов мета- qualone, которые в настоящее время сообщались, в том числе семи дигидро- диолов, девять фенолов, два methoxyhydroxyphenols, диолы и несколько триолов, все, кроме 2- и производных 2'-гидроксиметили бы по всей вероятности, связано с эпоксидным промежуточными продуктами. Ни один из этих эпоксидов еще не был выделен, однако (16). Масс-спектры показали, что три из dihydrodiol и оба hydroxydihydrodiols были сформированы путем эпоксидирования в толил кольца, в то время как масс-спектры двух других предложил эпоксидирования ядра хиназолинон. Авторы предположили, что из многих мочевых метаболитов мета- qualone, которые в настоящее время сообщались, в том числе семи дигидро- диолов, девять фенолов, два methoxyhydroxyphenols, диолы и несколько триолов, все, кроме 2- и производных 2'-гидроксиметили бы по всей вероятности, связано с эпоксидным промежуточными продуктами. Ни один из этих эпоксидов еще не был выделен, однако (16). Авторы предположили, что из многих мочевых метаболитов мета- qualone, которые в настоящее время сообщались, в том числе семи дигидро- диолов, девять фенолов, два methoxyhydroxyphenols, диолы и несколько триолов, все, кроме 2- и производных 2'-гидроксиметили бы по всей вероятности, связано с эпоксидным промежуточными продуктами. Ни один из этих эпоксидов еще не был выделен, однако (16). Авто

АНАЛИТИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА

Из-за широкое использование и злоупотребление метаквалона и из-за ее интересным обмен веществ, практически каждый в настоящее время популярного метод был применен для анализа препарата. Хотя структура Метаквалон предоставляет себя для spectrophotometric анализов, на практике такие методы редко достаточно чувствительны для определе- ния терапевтических уровней. Тем не менее, они нашли широкое применение в токсикологических исследованиях с участием валовой передозировки. Для спектрофотометрических анализов, экстракции гексана, а затем обратная экстракция с кислотой, чтобы восстановить метаквалон свободного от примесей фенольных, является предпочтительным, чтобы экстракции с более полярным растворителем, таком как хлороформ, поскольку последними дает смесь сильно УФ-поглощающим материалы с УФ-спектрами неотлично от метаквалона (1).

Коммерческий набор для радиоиммуноанализа (РИА) была проведена оценка для клинического обнаружения метаквалона в моче и крови (17,18). В то время как она оказалась быстрой техникой, которая не требуется никакого громоздким

подготовки образца, он не смог различить methaqua- одинокая и его метаболитов, некоторые из которых были в качестве реакционноспособного в качестве исходного соединения, и другие в меньшей степени или вообще не. Метаболиты предварительно отправлены были добавка в их влиянии на показаниях концентрации. Стандартные кривые получены RIA в сыворотке для метаквалона и пяти метаболитов продемонстрировали чувствительность обнаружения 2 нг / мл, а из-за вклад метаболитов в измеренных уровни, RIA в форме испытанной было бы полезно, как только процедуры скрининга.

Для получения количественных исследований, газовой хроматографии (ГХ) были разработаны методы, некоторые уровни отчетности обнаружения, как низко как 0,01 мкг / мл для метаквалона в плазме. Эта степень чувствительности была достигнута в способе, сообщаемые Берри в 1969 г., в котором участвовали экс- тяговые 5,0 мл плазмы, после регулирования pH добавлением 1,0 мл 1 н NaOH, 15 мл гексана, а затем с помощью газовой хроматографии на колонке с покрытием 3 процента cyclohexanedimethyl сукцинат. Butobarbital был использован в качестве внутреннего стандарта. Эффективность экстракции 96 процентов была сообщена для этого метода (19).

Эффективность экстракции 98-100 процентов сообщили на тех- NiQue, в котором насыщенный NaH₂ PO₃ раствор добавлял к сыворотке, с тем, чтобы осадить белки и липопротеины и бесплатно лекарство от сайтов связывания до экстракции н-гексан. После того, как центрифугирование, н-гексан фазу выпаривали в атмосфере азота при 57 ° C и остаток растворяют в ацетоне, содержащем hendecyl миристал в качестве внутреннего стандарта. Газовая хроматография на 3 процента OV-17 колонке с азотом в качестве газа-носителя при условии, чувствительность

1,0 мкг / мл метаквалон (20).

Количественный метаквалон и его пять наиболее распространенных гидроксильных метаболитов в моче проводили метод ОГО в недавнем исследовании, предназначенное для характеристики метаболита моделей в качестве возможных показателей метаквалона проглатывания. Метакавалон экстрагируют хлороформом из кислотостойкой гидролизуют мочи и хроматографируют на 3 процента OV-1 столбцов при 210 ° C. Для достижения полного разделения, метаболиты были силилировала и хроматографируют на высоком разрешении SE-30 колонок шотландца. Концентрации, измеренные в диапазоне от 0,20 до 1,24 мкг / мл метаквалона и 0,56 до 31,5 мкг / мл среди пяти основных гидроксильных метаболитов. Электронно-ударные масс-спектры метаквалона и триметил силильные эфиры метаболитов, разделенных GC на 3 процента OV- 17 колонки при 225 ° C, были использованы для подтверждения идентификации метаболитов (14).

Выбранный мониторинг ионов пришел в широкое использование в качестве высокочувствительного и специфического метода для измерения метаквалона, а также для идентификации и количественного определения его метаболитов. Ранняя попытка использовать метаквалон, меченного дейтерием на 2-метил подста- tuent в качестве внутреннего стандарта был оставлен из-за плохого изотопной чистоты. Тем не менее, 2-этил аналог метаквалонном добавляю к плазме перед экстракцией диэтиловым эфиром при условии, внутренний стандарт, пригодный для анализа ГХ / МС. Масс-спектрометр контролирует ток ионов при m / z = 250 для метаквалона и при m / z = 264 для внутреннего стандарта. Метод позволил измерение плазмы концентраций препарата, как низкий, как 5 нг / мл (10).

Более позднее использование ОГО / МС в исследованиях метаквалона привело к методам, позволяющим обнаруживать 0,20 нг / мл метаквалона и его метаболит 6- гидроксита в моче. Эта степень чувствительности была достигнута путем тщательной предварительной очистки экстрактов мочи с помощью многослойной хроматографии тонко-, использования multilabeled внутренних стандартов, в которых уровень немеченых соединений <0,01 процента, и из скопического анализа изотопных соотношений с помощью масс-спектрометрии с ионизацией поля который производит обильные молекулярные ионы с небольшим или **никакой фрагментацией. Heptadeuterated метаквалон был получен из коммерческого толуол-2 ЧАС 8 который был преобразован в o-toluidine-2 ЧАС 7 и конденсируют с N-ацетил-антралиновой кислоты. Heptadeuterated 6-гидрокси-мета- qualone аналогичным образом получены путем конденсации меченого o-to-luidine с 5-метокси-аминобензойной кислоты с последующим деметилирования. Внутренние стандарты были добавлены к ферменту-гидролизуют мочи образцов на до адсорбции на качестве XAD-2 колонки Amberlite и элюирование смеси этилацетата: хлороформ (3: 2, об / об). Из концентрированного элюата, метаквалона и 6-гидрокси метаболита были выделены хроматографа графии четыре раза на тонкослойных пластинах с, соответственно, бензол: н-бутанол: метанол (85: 10: 5); этилацетат: метанол: NH₄ OH (85: 10: 1); бензол: уксусная кислота (9: 1); и эфир. Другие гидроксильные метаболиты, присутствующие были, по-видимому устранены с помощью этой процедуры. Тех- Nique был применен к изучению кинетики ликвидации метаквалона в течение периода 11 дней после приема внутрь одной 250-мг таблетки, демонстрируя свою ценность в долгосрочных исследованиях, когда концентрация метаквалона, вероятно, снизятся до уровня, не обнаруживаемого обычные методы (10).**

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОЦЕДУРА

Терапевтические дозы метаквалоном являются относительно высокими (150-500 мг). Следовательно, простое, прямое извлечение 0,1 мл или более био- логической жидкости, как правило, достаточно, чтобы обеспечить достаточное количество лекарственного средства, подлежащего измерению с помощью ГХ / МС. Две процедуры экстракции описаны здесь. Обе эти процедуры являются относительно простым и быстрым. Первая процедура должна дать немного лучшее восстановление и обеспечивают более чистый экстракт, в то время как второй способ еще проще и полностью исключает испарение растворителя экстракта и, следовательно, воз- возможность потери небольших количеств лекарственного средства за счет испарения. В наших руках, точность и точность были сопоставимы с обоими методами.

Стандарты и реагенты

Метаквалона гидрохлорид, используемый в развитии этого Me- ТПК была приобретена у Applied Science Laboratories, State College, PA 16801. Нет примесей были обнаружены либо газа хроматографический или **масс-спектрометрии. Methaqualone-2 ЧАС 4 (2-метил-3-о-толул -4 (3H) хиназолинон-5,6,7,8 2 ЧАС 4) был получен из phthalimide-2 ЧАС 4 (21). На основе анализа ГХ / МС этого материала показал химический puri- ти больше, чем 99 процентов, и имели следующий изотопного состава: 2 ЧАС 4, 97,8 процента; 2 ЧАС 3, 2,1 процента; 2 ЧАС 1 а также 2 ЧАС 0 < 0,1 процента.**

Подготовка буфера pH 9,6 путем растворения 500 г калия моно- гидрофосфат ($K_2 HPO_4$) примерно в 500 мл дистиллированной воды. Дайте раствору остыть до комнатной температуры, а затем добавить достаточное количество дистиллированную воду, чтобы сделать ровно 1 литр.

Маточные растворы метаквалонем и methaqualone-2 ЧАС 4 получают следующим образом с целью определения стандартных кривых и предварительного стандартов обстрагвая работы. Взвешивание в 100-мл мерную колбу около 10 мг метаквалона, или около 11,4 мг гидрохлорида метаквалона, и записывают ее вес с точностью до 0,1 мг. Если гидрохлорид используется, эквивалентная масса свободного основания вычисляется путем умножения веса гидрохлорида 0,874. Растворить измеренный метаквалон примерно 75 мл метанола, а затем добавить дополнительный метанол, получая ровно 100 мл раствора. «Это решение будет именоваться как, 0,10 мг / мл исходного раствора», хотя оно должно быть меченым с его фактической концентрацией на основе точного измеренного веса метаквалона. Серия рабочих стандартных растворов затем могут быть получены путем соответствующего разбавления **исходного раствора, как описано в главе 2. 2 ЧАС 4 получают таким же образом. Для измерения метаквалона в жидкостях организма в диапазоне концентраций от 1 до 1000 нг / мл, добавление приблизительно 40 нг внутреннего стандарта на каждый мл жидкости тела, оказалось удовлетворительным. Это может быть удобно сделать путем добавления 100 мкл 400-нг / мл methaqualone-2 ЧАС 4 метанольный раствор на каждые мл жидкости тела. Подготовьте 1 мл раствора внутреннего стандарта 400 нг путем разбавлять Инга 1 мл 0,10 мг / мл исходного раствора methaqualone-2 ЧАС 4 до 250 мл метанола.**

Хранить запас и работы стандартных решений в хорошо закупоренных или заблокированных стеклянных сосудах в темноте при температуре ниже 0 ° C.

Экстракция-Метод 1

Передача 1 мл жидкости тела (цельной крови, плазмы или мочи) в 20-мл пробирку, снабженную тефлоновой футеровкой винтовой крышкой (от 0,5 до 2 мл образца может быть использован, но оно должно быть точно измерено). **Добавьте 100 мкл 400-нг / мл methaqualone-2 ЧАС 4 раствора и вихревые в течение 10 сек. Разрешить образец для уравнивания в течение примерно 15 мин и затем добавляют 1 мл $K_2 HPO_4$ буфер (pH 9,6) и 5 мл хлористого метилена.** Закрывают трубку и проверьте утечки вокруг крышки. Аккуратно перемешать содержимое в течение 30 мин с использованием моторизованной качалки или ротатора. Центрифуга в течение 5 мин, удалить верхний водный слой с помощью аспирации, а затем передать с помощью одноразовой пипетки Пастера экстракт methy- хлорида Лене (нижний слой), расположенных в силилированный концентрате трубку (> 5 мл объема), имеющая конический или фасонный сосок дно. Добавьте 20 мкл диметилформамид, чтобы действовать в качестве «хранителя растворителя», чтобы свести к минимуму потери испарительного метаквалона. Удалите метиленхлорид выпаривания при слабом токе азота или отфильтрованного воздухом при нагревании при температуре от 50 до 60 ° C. Когда объем экстракта уменьшается до примерно 20 мкл, закрывают пробирку или покрыть ее парафильмом и хранить при температуре <0 ° C до тех пор / МС ГХ-анализ не готов быть выполнена.

Экстракция-Способ 2

Передача 1 мл жидкости тела (цельная кровь, плазма или моча) к 5 мл со стеклянной пробкой, коническая **центрифужной пробиркой**. **Добавьте 100 μ л из 400-нг / мл methaqualone-2 ЧАС 4 Внутреннее решение** стандартных и вихревое течение 10 сек. Разрешить образец для уравнивания в течение 15 мин и **затем добавляют 1 мл К₂ НРО 4 буфер (рН 9,6), а затем 100 мкл растворителя, состоящего из толуола:** гептан: изоамилового спирта в объемном соотношении 70:20:10. Закрывают пробирку и вихрь в течение по меньшей мере 30 сек. Дельные фазы центрифугирования при 2000 x g в течение 15 мин. Органический растворитель должен образовать узкий верхний слой из которого Али-Quot может быть удален с помощью шприца для инъекций в ГХ / МС.

ГХ / МС анализ

Экспериментальные условия для ГХ / МС анализа метаквалонем заключаются в следующем:

ГХ колонок: 1,8 м x колонка 2 мм (ID), стекла упакованы с 3 процентами OV-1 или OV-17 на 100/120 меш Газ Chrom Q (Прикладные науки Лаборатория, State College, PA 16801)

Газ-носитель: Метан, 15-20 мл / мин Реагент газ:

Аммиак, вводится в ионную камеру, как описано в главе 2

Температура: Инжектор, 270 ° C

Колонка, 210 ° C изотермического ГХ / МС
линии передачи, 260 ° C Источник ионов,
160 ° C

В этих условиях метаквалона и methaqualone-2 ЧАС 4 должны элюировать при температуре около 4 мин в виде узких, симметричных пиков.

До начала ГХ / МС анализ образцов, производительность общей системы ГХ / МС должна быть оценена и оптимизирована, как описано в главе 2. Ионы, которые будут происходить при отслеживаемые м / з 251 и 255.

Они соответствуют протонированной молекулы ионы для метаквалона и methaqualone-2 ЧАС 4, соответственно.

С отбракованных клапаном в положении отбракованного, вводят органический экстракт в газовом хроматограф (от 2 до 4 μ л экстракта из Способа 1 или 5 до 10 μ л экстракта из Способа 2). Примерно через 1 мин переключить отбракованный клапан таким образом, что весь поток газа-носителя поступает в источнике ионов масс-спектрометре и начинает сбор данных. Когда мета- пики qualone ступицы элюирует, прекратить сбор данных и вернуть отбракованный клапан в положение переадресации.

Количество метаквалона в образце определяется mea- Suring высот (или зоны) на метаквалоне и methaqualone-2 ЧАС 4 **Пики в текущих профилях выбраны ионными («ионные хроматограммы») и связанные отношение высот пиков к калибровочной графике.** Функцию вычисления концентрации метаквалонем путем деления измеренного коли- Tity метаквалона точным объемом specimen извлеченного.

Обсуждение процедуры экспериментальной

Коэффициенты распределения метаквалона между водными фазами в некотором диапазоне значений pH и различных органических растворителей были измерены для того, чтобы определить оптимальные условия для экстракции лекарственного средства из биологических жидкостей. С этой целью был приготовлен маточный раствор метаквалона (100 мкг / мл) в 0,1N HCl. 5-мл аликвоты исходного раствора доводили до определенного pH и переносили в 25-мл с завинчивающейся крышкой трубки вместе с 5 мл органического растворителя. Трубку качали осторожно в течение 30 мин, а затем центрифугировали. Оптические плотности обоих водных и органических слоев измерялись от 350 до 250 нм с использованием 14 Сагу записывающих спектроскопических фотометра. Вода или соответствующий растворитель помещают в эталонную ячейку.

Результаты показали, что метаквалон экстрагируют хлороформом с почти одинаковой эффективностью при всех значениях pH от 2 до 12. При pH 10 хлороформа и метилхлорида почти одинаково эффективные экстракционные растворители, в то время как гексан и циклогексан являются менее эффективными. При pH 2 все растворители исследовали извлечь значительное количество косяка метаквалона. Следовательно, обратная экстракция в кислоту, которая часто используется в экстракциях наркотиков для удаления не- основных компонентов, может привести к потере значительной доли метаквалона. На основании этих данных, мы рекомендуем, чтобы pH биологической жидкости можно регулировать до 9-10 перед экстракцией метилхлорида,

Так как метаквалон не содержит NH или OH-группы, дериватизации еще до возникновения газовой хроматографии не является необходимым. Свободного газа препарат chromatographs также на различные упаковки колонки ГХ. и 3 процента OV-1 и 3 процент OV-17 на 100/120 меш Газ Chrom Q был успешно использован, но есть небольшое предпочтение для первого Ве- вызывает значительно более низкая температура колонок может быть использована. Электронным ударом (EI) и химической ионизации (CI), масс-спектры метаквалона показаны на рисунке 1. Эти спектры были получены на квадрупольные масс-спектрометры (22). Относительные чувствительности, достигнутые путем мониторинга ионного тока при значении m / z, соответствующей наиболее распространенного ион, генерируемого каждым из ионизации процессов приведены в таблице 1.

Если максимальная чувствительность желательна, DI метана и аммиака в качестве газообразных реагентов, должны быть использованы. Это комбинация дает немного лучшую чувствительность, чем это предусмотрено метаном только в качестве газа-реагента, а также более избирательный режим ионизации. Однако, так как уровни в плазме следующие терапевтические дозы метаквалона умеренно высокой (~ 5 мкг / мл), чувствительность, как правило, не является проблемой. При более высоких температурах источника ионов (> 160 ° C) в условиях ионов фрагментов CI метана при m / z 118 становится все более распространенным. Так как соответствующий **фрагмент иона в масс-спектре CI метана от methaqualone-2 ЧАС + сохраняет дейтерий метку, он появляется в m / z 122.** Следовательно, ионы при m / z 118 и 122 могут контролироваться в дополнении к протонированной молекуле ионов при m / z 251 и 255 для обеспечения confirmational данных.

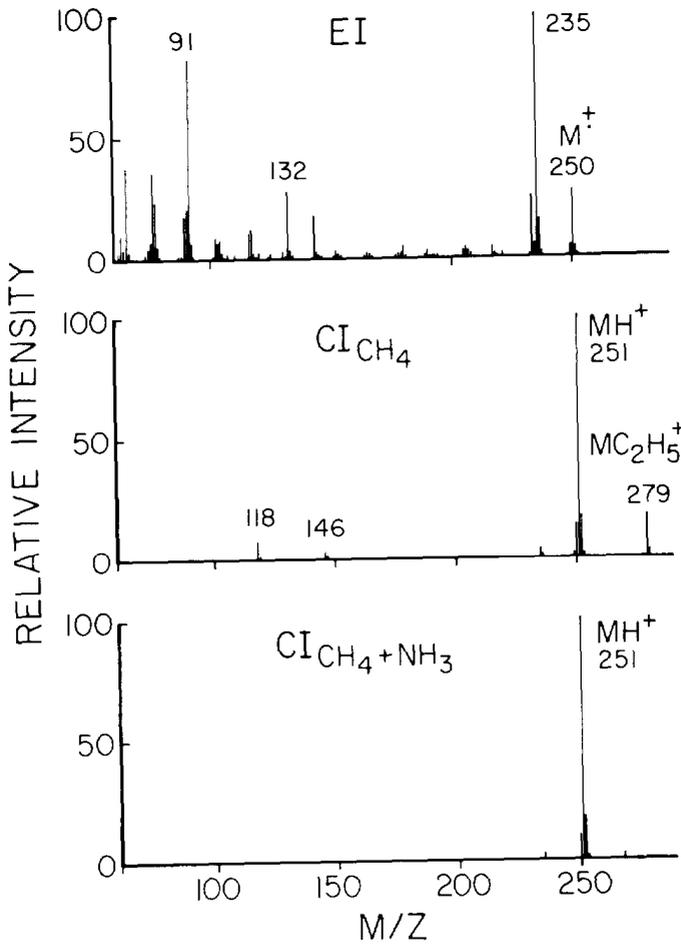


Рисунок 1. Масс-спектры Метаквалон

Таблица 1. Относительная РЕАКЦИЯ ДЛЯ ВЫДАЮЩИХСЯ ИОНОВ В
EI И ДИ Масс-спектры Метакавалон (22)

<u>Ионизация</u> <u>МЕТОД</u>	<u>м / г</u> <u>контролируемый</u>	<u>Процент</u> <u>образец Ion</u> <u>Текущий</u>	<u>Относительный ответ</u> <u>На единицу веса</u> <u>от наркотиков</u>
EI	250 (M +)	4	6
	235 (M + - CH ₃)	1,5	20
ДИ (CH ₄)	251 (MH +)	57	84
СИ (CH ₄ - Нью-Гемпшир ^э)	251 (MH +)	74	100

Когда были приготовлены растворы метаквалона и *sicosane* (внутренний стандарт) в метилхлориде и хранили в заблокированных флаконах при комнатной температуре, 2 ° С и -10 ° С, газовой хроматографии Анализ растворов в течение периода шести недель не показало каких-либо существенных изменений в соотношении эйкозаном и пиковой высоты метаквалон, указывая, что метаквалон стабилен в этих условиях.

Физические, химические и СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ДАННЫЕ ДЛЯ Метакалон

Номенклатура

Химическое название: 2-метил-3-о-толил-4 (3Н) -хиназолинон

Эмпирическая формула: C₁₆ H₁₈ N₂ O

Номер Chemical Abstracts реестра: _____ 72-44-6

Торговые названия: Многие, в том числе MAOA, MT3, TR 495, Catendyl, Dormogen, Fadormir, Hyprol, Melsomin, Mebedorm, NORMI-Nox, Omnyl, Parminol, Parest. (Quaalude, Roulone, Somnafac, Сонал, Somberol, Sohog, Fori- нол, Tuazolone

Физические константы

Внешний вид: белый кристаллический порошок Температуры

плавления: Свободное основание: 114-116 & deg; C

Гидрохлорид: 255-265 & deg; C

Удельное вращение: Оптический неактивны

Растворимость: Свободное основание практически не растворим в воде; растворимый в этаноле, эфире и хлороформе

pKa: 2,54 (4)

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С. Браун. В L, Reid, ред., Методические разработки в области _____
Биохимия, Vol. 5, стр. 179. Северная Голландия, Амстердам (1976).
2. JA Ostrenga. Clin. Toxicol., 4, 607 (1973). _____
3. С. Браун и С. Goenechea. Clin. Pharmacol. Ther., 14, 314 (1973). _____
4. JJ Zalipsky, DM Patel, RJ Darnowski и NH Reavey- Cantwell. J. Pharm. Sci., 65 (3), 460 (1976).

5. А. Ф. Делонг, Р. Смит, А. Полк, RK Найяк и NH Reavey- Cantwell. Архипелар Int. Pharmacodyn., 222 (2), 322 (1976). _____
6. Л. Kazyak, JA Келли, JA Селла, RE Дроге, LR Хильперт и RC-Permisohn. Clin. Chem., 3, 2001 (1977).

7. JM Кристенсен и С. Holfort. J. Pharm. Pharmacol., 2, 538 (1975). _____
8. С. Белый, Е. Дойл, Л. Ф. Chasseaud и Т. Тейлор. Europ. J. Clin. Pharmacol., 10, 343 (1976).

9. P. Morris, G. A. Gunderson, SW Babcock и JF Zaroslinski. Clin. Pharmacol. Ther., 13, 719 (1972).

10. Г. Алван, JE Линдгрэн, К. Bogentoft и О. Эрикссон. Europ. J. Clin. Pharmacol., 6, 187 (1973). _____
11. JM Макреинолдс, Н. d'А. Хека, и М. Анбар. Biomed. Massa Spectr., 2, 299 (1975). _____
12. P. Bonnichsen, К. Димберг, Ю. Marde и К. Ryhage. Clin. Хим. Acta, 60, 67 (1975) _____
13. CN Рейнольдс и К. Уилсон. Xenobiotica, 6 (2), 113 (1976). _____
14. RC Permisohn, LK Хильперт и Л. Kazyak. Дж судебной Sci., 21 (1), 98 (1976). _____
15. Д. Бернетт, CN Рейнольдс, К. Уилсон, и Дж.К. Франсис. Xenobiotica, 6 (2), 125 (1976).

16. WG Stillwell, PA Грегори и MG Horning. olism и распоряжение, 3 (4), 287 (1975). Drug Metab-

17. А. К. Берман, JP McGrath, KC Permisohn и JA Селла, Clin. Chem., 21, 1878 (1975).

18. RO Bost, CA Sutheimer, и я Саншайн. Clin. Chem., 22, 689 (1976). _____
19. DJ Берри. J. Chromatogr., 42, 39 (1969). _____
20. Д. Чин и Е. Fastlich. Clin. Chem., 20, 1382 (1974). _____
21. А. Ф. Фентимэн, младший и RL Фольц. J. меченых соединений и радиофармпрепаратов, 12, 69 (1976).

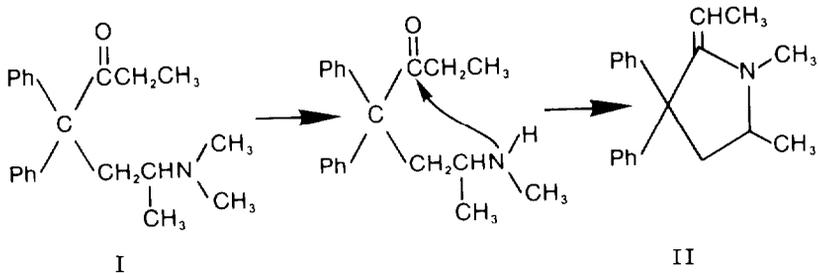
22. KL Фольц, DA Knowlton, ДВК Лин, А. Ф. Фентимэн, младший Труды Второй Международной конференции по изотопам Стабильно, Oak Brook, IL, 20-23 октября, 1975. _____

Метадон

Исследования в области фармакологии метадона (I) началось в 1946 году и в это время соединение установлено, является мощным наркотическим обезболивающим (1). Дальнейшие исследования обезболивающих эффектов метадон в человеке (2) привели к его последующему введению для контроля сильной боли. В отличие от морфина, метадон эффективен при приеме внутрь. В 1963 году метадон был введен в качестве экспериментального препарата для лечения героиновой зависимости (3). Дозировка метадона может быть сохранена или постепенно уменьшается для того, чтобы преодолеть физическую зависимость. Этот процесс «детоксикации» обычно проводят в течение продолжительного периода, в течение которого консультации и другие терапии, также работают. К сожалению, метадон имеет значительный потенциал злоупотребления таким образом, что распределение препарата необходимо тщательно контролируемые.

METABOLISM и фармакокинетики

Первичный путь метаболизма метадона в человеке является N-демети- лияционный с последующей циклизацией с получением пирролидина метаболита (II) (4):



Дополнительные метаболиты, в результате дальнейшего N-деметилования, гидроксирования ароматического кольца, и деградации обеих боковых цепей, были идентифицированы.

Фармакокинетика метадона в человеке хорошо изучена (5,6,7). Одно исследование (5), по сравнению острый и хронический ства от метадона postaddict добровольцев. После однократного 15 мг перорально в дозе, концентрация метадона в плазме показали биэкспоненциальной распад; первая фаза соответствовала элиминации плазмы полураспада около 14 ч, а второй фазы с периодом полураспада приблизительно 55 ч. Метадона в плазме концен-

трация измеренная при 2 ч после введения составляла 85 ± 10 нг / мл. При хроническом пероральном введении лекарственного средства, плазма концентрации прошли одну экспоненциальное затухание со средним периодом полураспада 22 ч. Пациенты ежедневно поддерживается на 40-мг дозы показали средние концентрации метадона в плазме 182 ± 35 нг / мл, в то время как те, кто получает 80-мг дозы показали средний ежедневно метадона процесс концентрации от 420 ± 97 нг / мл плазмы. Другое исследование (8) нашли ликвидации плазмы период полураспада 7,3 часов после внутримышечного введения 10 мг метадона. Совсем недавно, отмечены изменения в фармакокинетике препарата между отдельными человеческими субъектами нефа был зарегистрировано среди 12 в больнице метадон Main-tenance пациенты, среди которых дозируют коэффициенты концентрации в плазме варьировали в широких пределах от одного субъекта к другому, как и в плазме полураспада метадона (от 7 до 21 ч). Восстановление препарата из мочи колебалось от 23 процентов до 52 процентов от общего потребления в 24-часовых образцах (9).

Метадон выводится из организма в основном как исходное лекарственное средство (I) и пирролидина метаболит (II). После однократной дозы, в моче было обнаружено содержание около половины столько метаболита как исходного лекарственного вещества, выраженное в процентах от суточной дозы в 24-часовой коллекции, в то время как хроническое введение препарата венной процент метаболита в вдвое больше, чем лекарства. Метаболит всегда была преобладающей формой в кале (5). Увеличенная скорость метаболизма и экскреции при хроническом адми-istration предполагает, что индукция печеночных ферментов микросо, ответственных за метаболизм лекарственных средств может играть существенную роль в развитии толерантности к препарату. Тем не менее, как было показано на крысах, что метадон не увеличивает метаболизируемые системы микросомальных ферментов лизинг наркотиков (10). Патологоанатомическое исследование тканей от пользователей метадона показали наличие как лекарственного средства и метаболита в печени, почек, селезенки и головного мозга; и особенно высокие концентрации в легких (11).

АНАЛИТИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА

Чувствительные и специфические методы анализа метадон в биологических жидкостях необходимы для того, чтобы более точно оценить фармакокинетики препарата, а также внести свой вклад аналитической информации для корреляции с клиническим состоянием пациентов, глотать лекарство как в обслуживании и передозировках ситуации. Тонкослойная хроматография (ТСХ) (12), УФ-спектрофотометрии (13), флуориметрии (14), биологический анализ (15), радиоизотопы (16), газовая хроматография (ГХ) (17-19), и газовой хроматографии / масс-Spectrom - етРИ (20,21), были использованы для обнаружения и количественного определения метадона.

Иммунологические методы, которые хорошо подходят для анализа больших партий образцов, доступны для обнаружения метадона в моче, а также обладают высокой чувствительностью. Радиоиммунологическая (РИА) может обнаружить метадона в моче следующих дозах всего лишь 2,5 мг / день, и показывает обещание как метод скрининга, поскольку про-рохурфене и его метаболиты не мешают, поскольку они часто делают в ТСХ и процедур GC (22). Тем не менее, антитело, используемое для RIA,

гемагглютинации ингибирование, или фермент, умноженный иммуноанализ (испускает) не вступает в реакцию с первичным метаболитом II в концентрациях, 1000 мкг / мл или менее. Поскольку концентрация II часто равна или больше, чем концентрация метадона в моче, ее обнаружение имеет большое значение при низких концентрациях препарата. Даль- Thermoге, ни один из иммунологических методов не являются количественными над нормальным диапазоне концентраций метадона, обнаруженных в моче (23).

были найдены самые удовлетворительные методы количественного метадона в био- логических жидкостей включают газовой хроматографии. Комбинация GC с электронным ударом масс-спектрометрии (GX / EI-MS) была использована для количественного определения метадона в плазме крови человека (20). Гомолога метадона был использован в качестве внутреннего стандарта, с тем, что оба немеченого и дейтерий-меченных метадона может быть администрировано и одновременно измерены в плазме. Способ включает уравнивание 4 мл плазмы с внутренним стандартом, согласования уровня pH до 9,5, и экстрагировали 1-хлорбутана. Колонка ОИ была упакована с 1 процентом УСС-98 и работает при температуре 190 ° С. Ионы отслеживаемые соответствует M + - CH₃ для метадона (m / z 294), methadone-2 ЧАС (m / z 297), а внутренний стандарт (m / z 308). Чувствительность метода была ограничена относительно низкой абундансией ионов отслеживаемых. Под ударной ионизацией электронов большей части ионного тока для метадон осуществляются с помощью низких ионов массовых фрагментов МЕНТА, которые непригодны для выбранного мониторинга ионов. Тем не менее,

способ, как сообщается, способный измерять метадон такой низкой концентрации, как 5 нг / мл с относительным стандартным отклонением менее чем на 4 процента.

GX / MS процедура с использованием химической ионизации, как сообщается, будет примерно в пять раз более чувствителен, чем электронным ударом методом ионизации из-за большего относительного содержания ионов в области молекулярного иона в масс-спектре ДИ метадона (21), Метадон, содержащий пять атомов дейтерия, присоединенные к одному ароматическому кольцу, был синтезирован для использования в качестве внутреннего стандарта в данном анализе. Извлечение из плазмы или мочи, после добавления дейтерированного стандарта и корректировки pH 9, был с этилацетатом, а затем обратной экстракции в 0,05 N HCl. Газовая хроматография проводили на колонке 10 процентов W-98 по газу Chrom Q при температуре 180 ° С. Коэффициенты численности Iop были измерены с использованием изобутана химические ионизации, в которой ионы протонированной молекулы при m / z 310 для метадона и 315 для метадон контроллировались.

Methadone-2 ЧАС и также соответствующие decadeuterated мета- сделанные метаболиты были синтезированы для применения в метаболических исследований и в качестве внутренних стандартов для анализа GX / MS (24). Меченые соединения также оказались полезными в выяснении процессов фрагментации электронов воздействия на метадон и его метаболиты. Способ ОГО сообщался для количественного метадон с использованием детектора захвата электронов (ECD) участвует извлечение метадон из плазмы с помощью n-гептана с последующим обратной экстракцией в кислую водную фазу. Водный экстракт затем окисляют с оксидом бария для преобразования метадона бензофенон, чтобы получить более сильную реакцию ECD. Метод, как сообщается, чувствительность сравнимым к GC технике / EI-MS (17).

Некоторые анализы метадона с использованием GC с помощью обычных детекторов Тион пламени-ioniza- (FID) были опубликованы. В одном из них, предназначенный для определения метадона в моче наркоманов в программе поддерживающей терапии метадоном, 10 мл мочи доводили до pH 9,5 и экстрагируют хлороформ изопропанол (3: 1). Колонка ОЙ была упакована с 3 процентами OV-17 и работает при температуре 240 ° C. 4-бензил- бифенил был использован в качестве внутреннего стандарта. Метод может чественный titate метадон в моче в диапазоне концентраций от 3 до 30 мкг / мл с относительным стандартным отклонением 7 процентов (18). Aпо- Ther методом ГХ измеряли концентрацию метадона в крови, плазме или моче с помощью процедуры, состоящей из добавлением n-docosane в качестве внутреннего стандарта, извлечение жидкости организма (pH доводили до 9,5) с 1-хлорбутана, и газовой хроматографии на 4- футов 1 процент W-98 колонки поддерживали на уровне 165 ° C. Минимальная концентра- ция метадона, которая может быть измерена с помощью этой процедуры составляла 15 нг / мл с использованием 3 мл крови или плазмы (19). Подобная процедура начальной экстракции (1-хлорбутан) была использована в другом GC анализе, но дальнейшая очистка извлеченного метадон была достигнута за счет обратной экстракции в 0,2 N HCl. Экстракт водного кислоты затем подщелачивают и экстрагируют хлороформом. Препарат (SKF-525 A) со структурой, аналогичной метадоном использовали в качестве конечного меж- стандарта. Газовые хроматографический анализ использовал 3 пер- цент SE-30 колонку, эксплуатируемую при 200 ° C. Этот метод может обнаружить лишь как 15 нг / мл метадона в 4 мл плазмы (8). Метод ОГО-ПВД с помощью SKF 525-A в качестве внутреннего стандарта был адаптирован к одновременному определению метадон, пирролидин метаболита, кокаин, метаквалона, фенциклидин, и пропоксифен в малых (3 мл) объемах мочи, с le- обнаружения Велс, как низко как 0,5 мкг / мл. Препараты извлекаются вместе в тита- так в оригинале pH с помощью толуола: изоамиловый спирт: гептан (76: 4: 20) и превращают в их менее летучих солей гидрохлорида добавлением 1 -ной HCl пер- в метаноле; сообщенное эффективность экстракции для мета- сделано и его метаболита составляет 100 процентов. Остаток после evapog- ирования восстанавливает в метаноле и подвергает газовую хроматографию на 2 процента W-98/1 процент OV-17 смешанный слой колонки. Для оптимальной точности в этой процедуре, силилированного стеклянной посуды и свежего буферного раствора для внутреннего стандарта являются обязательными (25). Недавно сообщалось улучшение процедуры экстракции для метадона увеличена чувствительность анализа на ГХ-FID до 5 нг на мл метадона в 15-мл пробы цельной крови. Способ включает извлечение метадона и внутреннего стандарта (2-диметиламино-4,4-дифенил-5- попаноне, специально синтезированы для анализа) с 1-chlorobu- Тане при pH 9,8, обратной экстракции в 0.5MН₂ ТАК₄, подщелачивание и реэкстракция в хлороформ. Серная кислота была использована вместо HCl, так как сульфат метадона имеет лучший коэффициент распределения (1-хлорбутан: вода), чем хлористоводородной соли при pH от 0 до 2.

В некоторых образцах, водная фаза должны была быть равновесию brated с 2,2,4-триметилпентаном для разрушения эмульсии, сформированной после того, как **уравновешиваний Н₂ ТАК₄ и 1-хлорбутана слои. Ни шаг испарения не требуется. Восстановление 14 С-меченый** метадон из цельной крови с помощью этой процедуры составляет ~ 93 процентов. Хроматографический было сделано на 1,5 процента OV-101 по газу Chrom Q с температурой от запрограммированной 170- 250 ° C (26).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОЦЕДУРА

Относительно простая процедура экстракции используется для удаления мета- сделано из биологических жидкостей. Процедура состоит из добавления дейтерий-меченных метадона к образцу вместе с буфером, pH 9,5, с последующей экстракцией с 1-хлорбутана. Химическая ионизационных зации с метаном и аммиаком в качестве газообразных реагентов используется для анализа ГХ / МС.

Стандарты и реагенты

д, 1-Метадон (6-диметиламино-4,4-дифенил-3-гептанон) был Пур чеканка в виде соли гидрохлорида из Regis Chemical Company, Morton Grove, IL 60053. Анализ с помощью газовой хроматографии и масс-спектрометра ницах указывают на то материал был лучше, чем 99 процентов чистой. Метадон-1,1,1-2 ЧАС з гидрохлорид был получен из Национального института по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами. Дейтерированный метадон хрома- графически чистые (> 99 процентов), и на основе его аммиак ДИ масс-спектр, содержал изотопный состав 2 ЧАС з, 96,9 процента;

2 ЧАС з, 1,9 процента; 2 ЧАС 1, 0 процентов; а также 2 ЧАС о, 1,2 процента. Подходящий pH 9,6 буфер может быть получен путем растворения 500 грамм моногидроортофосфата фосфата калия ($K_2 HPO_4$) примерно в 500 мл дистиллированной воды. Когда вся соль растворяется, позволяють реше- ние, чтобы охладить до комнатной температуры и добавить достаточное количество воды, чтобы дать ровно 1 литр.

Маточные растворы метадона и methadone-2 ЧАС з используется для определения объемов калибровочных графиков (глава 2) и в качестве эталонных стандартов, получают следующим образом. Взвешивание в 100-мл мерную колбу 11,2 мг метадона гидрохлорида. Растворить метадона hydrochloro- ездку в метаноле и доводят до 100 мл ровно с дополнительным количеством метанола. Полученный маточный раствор соответствует концентрации 0,10 мг / мл метадона в расчете на свободное основание. Серия стан- Дард решений, то могут быть получены путем соответствующего разбавления исходного раствора, как описано в главе 2. Исходный раствор methadone-2 ЧАС з получают таким же образом. Для измерения метадона в крови или моче в пределах диапазона кон- центрированы от 1 до 1000 нг / мл, добавление приблизительно 40 нг внутреннего стандарта, чтобы каждый мл образца является удовлетворительным. Это может быть удобно сделать путем добавления 100 μ л из 400-нг / мл мета- done-2 ЧАС з метанольный раствор на каждый мл образца. Подготовьте / мл стандартного раствора 400 нг путем разбавления 1 мл 0,10 мг / мл исходного раствора метадона 2 ЧАС з до 250 мл метанола. Хранить запас и стандартные растворы в темноте в хорошо закупоренных или заблокированных стеклянных сосудах при 0 ° С или ниже. При комнатной температуре, кислые растворы метадона неустойчивы; они проходят примерно 40 процентов разложена позицию в течение двух недель.

экстракция

Передача 1 мл образца (цельной крови, плазмы или мочи) в 20-мл пробирку, снабженную тефлоновой футеровкой винтовой крышкой (от 0,5 до 2 мл образца может быть использован, но оно должно быть точно измерено). Добавьте 100 μ л из 400-нг / мл methadone-2 ЧАС з внутренний стандарт решение

образца и вихрь в течение 10 сек. Разрешить образец для уравнивания в течение примерно 15 мин и затем добавляют 1 мл буфера pH 9,5 и 5 мл 1-хлорбутана. Закрывают трубку и проверяют утечки вокруг крышки. Аккуратно перемешать содержимое в течение 30 мин с помощью моторизованной качалки или RO- Tator. Центрифуга в течение 5 мин, а затем передать 1-хлорбутан слой (вверх) с силилированным концентратором трубки, по меньшей мере, в 5 мл VOL- умз и имеющую коническую или ниппель-образную форму дна. Добавьте 20 мкл ди- метилформамид как «хранитель» растворитель, чтобы свести к минимуму потерю испарительного метадона. Удалите 1-хлорбутан выпаривания с нежным потоком азота или отфильтрованным воздухом при нагревании при 40-50 ° С. Когда объем экстракта уменьшилось до приблизительно 20 мкл, закрывают пробирку или покрывают верхнюю часть с парафильмом и хранить при температуре ниже 0 ° С до тех пор / МС ГХ-анализ не должен быть выполнен.

Непосредственно перед анализ, позволяет трубке нагреться до комнатной температуры.

ГХ / МС анализ

Следующие экспериментальные условия являются удовлетворительными для ГХ / МС анализа метадона:

ГХ колонка: 1,8 м x колонка 2 мм (ID), стекла упакованы с 3 процента OV-17 на 100/120 меш Газ Chrom Q (Прикладные науки Лаборатория, State College, PA 16801)

Газ-носитель: Метан, 15-20 мл / мин

Температура: Инжектор, 260 ° С
Колонка, 210 ° С
ГХ / МС линии передачи, 210 ° С Источник ионов, 160 ° С

В этих условиях метадон и methadone-2 ЧАС з должны элюировать при температуре от 3 до 5 мин в виде узких, симметричных пиков.

Перед началом ГХ / МС анализ образцов, производительность общей системы ГХ / МС должна быть оценена и оптимизирована, как описано в главе 2. Ионы, которые будут происходить при отслеживаемые м / з 310 и 313.

Они соответствуют протонированной молекулы ионы для метадона и метадона 2 ЧАС з, соответственно. С отбракованных клапаном в положении отбракованного, вводим от 2 до 6 мкл экстракта в газовом хроматограф. Примерно через 1 мин переключить отбракованный клапан таким образом, что весь поток газа-носителя поступает в источнике ионов масс-спектрометра, и начинается сбор данных. Когда пики метадонных элюировало, прекратить сбор данных и вернуть отбракованный клапан в положение отбракованного.

Количество метадона в образце определяется путем измерения высоты (или зоны) на метадон и methadone-2 ЧАС з Пики в текущих профилях выбраны ионными («ионные хроматограммы») и ванное отношение высот пиков к ранее установленному calibra- ного графу. Вычислить концентрацию метадона в био- логического образца путем деления измеренного количества метадона точным объемом образца, используемых в анализе.

Обсуждение процедуры экспериментальной

Выбор 1-хлорбутана в качестве растворителя для экстракции был основан главным образом на работе Салливана и Блейка (19), который показал, что одним из наиболее эффективных растворителей для удаления метадона из биологических жидкостей. Кроме того, он извлекает минимальные количества эндогенных материалов. Эффективность экстракции зависит от pH, с максимальным восстановлением 85 процентов при экстракции сделаны при pH от 9,5 до 10,0.

Из упаковки колонки GX оценивали, 3 процента OV-17 на 100/120 меш Gas Chrom Q дал наилучшее сочетание хорошей разрешающей способности и мини-колонки мама кровоточить, а также подходящее время удерживания метадона. Электронным ударом (EI), метан химической ионизации (CHI_{CH_3}), и метан-аммиак химической ионизации (CHI_{CH_3-N}) масс-спектры метадона показаны на рисунке 1. Масс-спектр EI доминирует интенсивный пик при m/z 72, соответствующий фрагмент иона $CH_3CH=N(CH_3)2^+$. Этот ион не подходит для выбранного мониторинга ионов, так как это происходит при значении AM/g , где мешающие ионы, вероятно, и даже более важно, соответствующий фрагмент ион из дейтерированного метадон не удерживает этикетку дейтерия. Ни в одном из более высоких масс ионов в масс-спектре EI не достаточно в изобилии, чтобы быть удовлетворительным для выбранного мониторинга ионов. С метана только в качестве газа-реагента, протонированная-молекулу иона при m/z 310 и фрагмент иона при m/z 265 имеются в изобилии и являются удовлетворительным для выбранного мониторинга ионов. Мониторинг с избытком ионов мента чем фрагмент, в дополнении к протонированному иону молекулы обеспечивает дополнительную уверенность в достоверности количественных Измерения (см глава 2). Однако,

1). Кроме того, вклад methadone-2 ЧАС в внутренний стандарт в m/z 310 ионного ток немного меньше (1,0 процента против 1,9 процента) под аммиаком Cl, чем при Cl метане. По-видимому, в последнем случае имеет место некоторая абстракция и дейтерий. Следовательно, небольшое количество метадона может быть измерена более точно в присутствии большого количества внутреннего стандарта при использовании аммиака DI. Наконец, добавление аммиака к реагенту газа приводит к более селективной ионизации, так как неосновные соединения не ионизованным.

По нашему опыту, при использовании в одиночку метан, интерференция ионы Ing предотвратить надежное количественное определение низких концентраций метадона (<10 нг / мл) в плазме крови. Помехи не были про- когда я проблема смеси метан-аммиак используют в качестве газа-реагента.

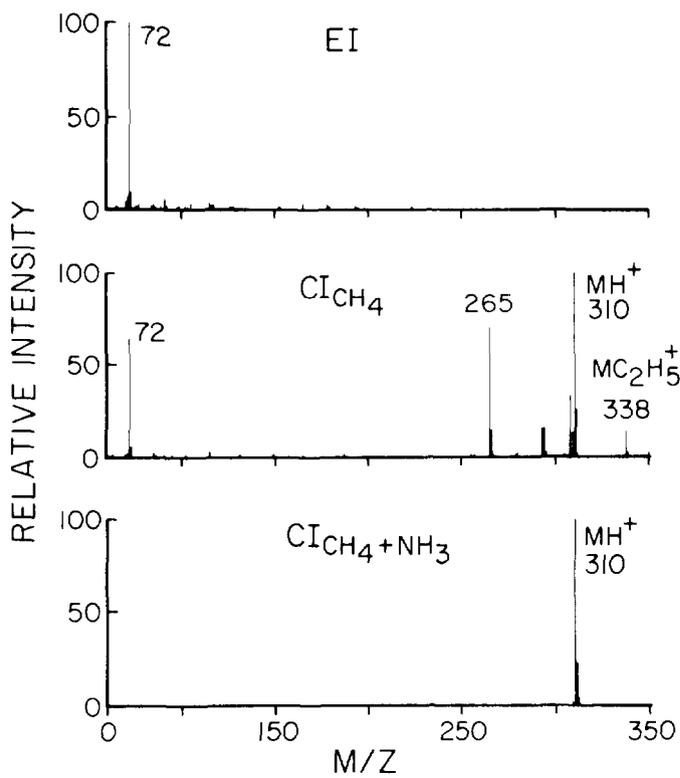


Рисунок 1. Масс-спектры метадона

ТАБЛИЦА 1. Относительная РЕАКЦИЯ ДЛЯ ВЫДАЮЩИХСЯ ионов в EI и CI масс-спектрах метадон

Ионизация МЕТОД	м / г контролируемый	Процент образца ИОННЫЙ ТОК	Относительный ответ На единицу веса от наркотиков
EI	309 (M +)	<0,1	<0,1
	$\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \\ 72 (\text{CH} = \text{N}^+ \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}) \end{matrix}$	54	750
ДИ (СН ₄)	310 (MH +)	24	30
ДИ (СН ₄ + Нью-Гемпширэ)	310 (MH +)	76	100

Физические, химические и SPECTROMETRIC ДАННЫЕ ДЛЯ МЕТАДОНОМ

Номенклатура

Химическое название: д, 1-6-диметиламино-4,4-дифенил-3-гептанол

Эмпирическая формула: C₂₁ H₂₇ N

Числа Chemical Abstracts реестра: _____ д, 1-Метадон, 297881
д, 1-метадона гидрохлорид, 125564

Торговые названия: Amidone гидрохлорид, Adanon гидрохлорид, Dolophine гидрохлорид, Physeptone, Heptadon гидрохлорид

Физические константы

Температуры плавления: _____ 1-Метадон: 99-100 ° C 1-метадона гидрохлорид:
241 ° C
д, 1-Метадон: 78 ° C
д, 1-метадона гидрохлорид: 233-236 & deg; C

Показатель преломления: _____ д, 1-метадона гидрохлорид (п_{25D}) = 1.5299

Удельное вращение: 1-Метадон $[\alpha]_D^{20} = -32^\circ$ (in ethanol)
1-Метадон HCl $[\alpha]_D^{20} = -169^\circ$ (C=2.1 :

pKa 8,25

Растворимость D, L-Метадон HCl: Вода 12 г / 100 мл
Этанол 9 г / 100 мл Изопропанол 2,4 г / 100 мл

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. СС Скотт и КК Чен. J. Pharmacol. Exp. Ther., 87, 63 (1946). _____
2. H. Isbell, AJ Eisenman, A. Wikler и К. Франк. J. AcOI Фарм. Exp. Ther., 92, 83 (1948). _____
3. В. П. Дол и М. Nyswander. J. Amer. Med. Доц., 193, 646 (1965). _____
4. АН Беккет, JF Тейлор, А. Ф. Сасы и ММА Хассан. J. Pharm. Pharmacol., 20, 754 (1968). _____
5. K. Verebely, Дж Volavka, С. Mule и Р. Резник. Clin. Pharmacol. Ther., 18, 180 (1976). _____
6. E. Anggård, L.-M. Gunne, Дж Holmstrand, RE McMahon, С.-G. Сандберг и HR Sullivan. Clin. Pharmacol. Ther., 17, 258 (1975). _____

7. MJ Kreek. Штат Нью-Йорк J. Med., 73, 2773 (1973). _____
8. CE Inturrisi и К. Verebey. J. Chromatogr., 65, 361 (1972).
9. АК Dhar и Н. Kutt, Fed. Proc., 35, 565 (1976). _____
10. AP Альварес и А. Каппа. J. Lab. & Clin. Med., 79, 439 (1972). _____
11. АЕ Робинсон и FM Williams. J. Pharm. Pharmacol., 23, 353 (1971). _____
12. CM Davis и DC Фенимор. J. Chromatogr., 104, 193 (1975). _____
13. Его Гамильтон, JE Уоллес и К. Блюм. J. Pharm. Sci., 63, 741 (1974). _____
14. EJ McGonigle. Анальный. Chem., 43, 966 (1971). _____
15. СТ Liu и FL Адлер. J. Immunol., 111, 472 (1973). _____
16. Л. Мишра, Р. Блох, NL Vadlamani и SJ мул. J. Phar- MACOL. Exp. Ther., 188, 34 (1974). _____
17. П. Hartvig и Б. Наслунд. J. Chromatogr., 111, 347 (1975). _____
18. JL Валентина, PE Wiegert и KL Чарльз. J. Pharm. Sci., 61, 796 (1972). _____
19. HR Sullivan и Д. Блейк. Местожительство Commun. Химреагент Pathol. Pharmacol., 3, 467 (1972). _____
20. HR Sullivan, FJ Маршалл, RE McMahon, E. Anggard, LM Gunne и JH Holmstrand. Biomed. Масса Spectr., 2, 197 (1975). _____
21. DL Hacheу, MJ Kreek и DH Мэтсон. J. Pharm. Sci., 66, 1579 (1977). _____
22. DL Рериг, RИH Ван, М. М. Мюллера, Д. Л. Lewand и SM Адамс. Clin. Chem., 22, 1915 (1976). _____
23. NC Джейн, WJ Leung, ТЦ Снит, РД Бадд, и Д. Чинн. J. Anal. Toxicol., 1, 6 (1977). _____
24. GI Кан, FS Abbott, Р. Бертон. Biomed. Масса Spectr., 6, 179 (1979). _____
25. NC Jain, DM Chinn, ТС Снит и RD Бадд. J. Anal. Toxicol., 1, 192 (1977). _____
26. RK Линн, Р. Леже, WP Гордон, Г. Д. Олсен и Н. Gerber. J. Chromatogr., 131, 329 (1977). _____

Δ^9 -Тетрагидроканнабинол (ТНС) и два из ее метаболита, 11-гидрокси- Δ^9 -ТНС и 11-нор-9-карбокси- Δ^9 -ТНС

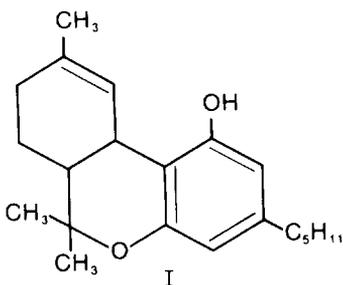
Использование смолы конопли, Cannabis Sativa, для исцеления и седатативных целей старо как истории. Из письменных ссылок на его использование в качестве хирургической анестезии в китайской pharmacopoeia 15-го века до нашей эры до современности, история и знание конопли охватили широкий спектр медицинских применений, некоторые без значения, так как при лепре, и другие, по-видимому оправданным (1). Его использование в качестве галлюциногенов и седатативной было красочная история, а также; термин «убийца» был доставлен в Европу возвращающихся крестоносцев ссылки на арабскую религиозную секту 11-го века, чья преданные (Hashishin) якобы использовал препарат, чтобы вызвать экзотические видения рая перед выходом на потенциально суицидальных миссиях политического убийства. Известный в различных частях мира, как «марихуана», «гашиш», «Кифа», «гашиш», «Или, марихуана,» марихуана в его сыром виде едят или курят. Активность препаратов колеблется в широких пределах в зависимости от штамма botani- кала и части растений, используемых (2). Каннабис сохраняет свою биологическую активность в течение длительного времени при хранении в этаноле или в кунжутном масле, но активность снижается под воздействием света и кислорода, который помогает счет вариации в результатах ранних исследований, касающихся его фармакологии и психотомиметические эффектов (3,4) ,

ФАРМАКОЛОГИЯ

Систематическое изучение фармакологии конопли развивалась только в последние 12 лет, после полного синтеза Δ^9 -тетрагидроканнабинол (ТНС *, 1), основной активный компонент растительного материала (5). Последнее фармакологическое исследование показало, лекарство, чтобы иметь эффекты, которые потенциально терапевтические, такие как чешка обработки внутриглазного давления, бронхов, противосудорожное действия, и замедления роста опухоли (6,7,8). Однако психотомиметические эффекты каннабиса, в то время как имеющие некоторый потенциал для терапевтического применения в себе (обезболивание, антидепрессивное действие, и т.д.), привели к широкому распространению злоупотребления с социальными и общественными последствиями для здоровья. Например, вклад опьянения каннабиса в дорожно-транспортные происшествия является предметом интенсивного исследования (9), так как

* В этой главе термин «марихуана» будет использоваться для обозначения растительных препаратов, содержащих смесь каннабиноидов, в то время как «ТНС» будет представлять собой изолированный или синтетические тетрагидроканнабинол, Δ^9 -ТНС, присутствует в небольших количествах хотя по меньшей мере, один другой активной форме, Δ^9 -ТНС, присутствует в некоторых экстрактах.

основные субъективные эффекты ТНС искажения перхлорэтилена seption и времени, и ухудшение кратковременной памяти. ТНС действует на септальной области лимбической системы головного мозга, где структуры, контролирующие эмоциональное поведение расположены (10).



Взаимодействие ТНС с другими лекарственными средствами также практический ный интерес. ТНС ослабляет морфин-абстинентного синдром осаждаёт налоксон, но усугубляет симптомы отмены алкоголя, и это продлевает эфирный наркоз. Различные компоненты конопли, как известны, ингибируют ферменты печени, что прелятствует детоксикации других лекарственных средств (3).

Токсикологические исследования показали канцерогенный потенциал в копченом каннабисе; дымовые конденсаты содержат значительно большее количество полициклических углеводородов, чем табачный дым (11). Car- diovascular эффекты ТНС включают гипотензию и тахикардию, а также снижение кровотока в некоторых областях мозга было показано в экспериментальных животных. Толерантность к сердечной и кровяное давление эффекты, а также психотропных эффектов может развиваться (12). Нет из необратимых патологических изменений не были показаны, что в результате ТНС организаторских страций; Однако, есть сообщения, которые предполагают возможные эффекты ТНС на иммунных реакции, эндокринологической функции и клеточной мета- результате закупорки. Они могут иметь важное клиническое значение, особенно в связи с отчётным сохранением ТНС в организме в виде липидных конъюгат (13). Из-за его высокой растворимости в липидах, ТНС медленно выводятся из организма, и он накапливается в тканях. Было сообщено, что даже незначительное количество ТНС нарушают клеточный метаболизм, предотвращая образование ДНК, РНК и белка и повторно Tarding деление клеток. Там также представляется увеличение inci- рия аномальных форм sprennatoza и снижение количества сперматозоидов у самцов потребителей каннабиса (10). Химия и фармакология ТНС были предметом обширных недавних обзоров (14,15,16). Там также представляется увеличение inci- рия аномальных форм sprennatoza и снижение количества сперматозоидов у самцов потребителей каннабиса (10). Химия и фармакология ТНС были предметом обширных недавних обзоров (14,15,16).

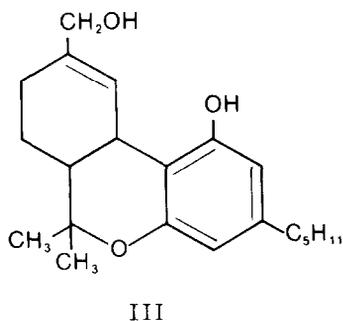
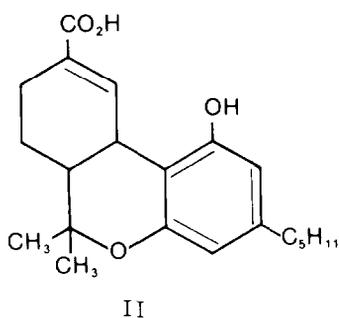
Фармакокинетика и метаболизм

ТНС имеет низкую растворимость в воде и плохо всасывается через желудочно-кишечный тракт. Вдыхание или внутривенное введение, how-либо, вызывает быстрое повышение концентрации ТНС в плазме с последующим постепенным снижением в соответствии с двухфазной рисунком ликвидации (17). Физиологический «высокий» соответствует времени максимального ТНС сгущения в крови.

Каннабиноиды легко метаболизируется в организме млекопитающих; более 50 cannabi- Noid метаболитов были определены, с вариациями среди видов,

Существует ряд доказательств для дифференциального обмена между легким и печенью в пределах того же вида (3). Многочисленные biotransforma- пути Тиона для ТНС известны, в том числе и алиливого алифатические гидроксирований; окисления к действию кислот, альдегидов и кетонов; кон- jugations с кислотой или жирными кислотами глюкуроновой; эпексидирование двойной связи; и снижение терпенов двойной связи. Эти био- преобразования могут происходить по отдельности для получения монозамещенные мета- bolites, или в сочетании с образованием диолов, триолы, оксикислоты, гидрокси- кетоны, или замещенные hexahydrocannabinols (18). У человека, превращение ТНС в биологически неактивный 11-нор-9-карбокси-

Δ⁹- ТНС (II) является основным метаболическим путем. Основной начальный био- продукт превращения ТНС является его 11-гидрокси производный (III), в котором в равной степени и, возможно, более активны, чем ТНС, но, как и его предшественник он недолговечен в организме и редко появляется в моче. Последние эксперименты с радиоактивно ТНС на крысах показали, что III, проникает через гематоэнцефалический барьер более легко, чем делает ТНС, возможно, из-за его высокой аффинности к альбумина плазмы, а не липопротеинов, к которому ТНС связан (19).



Очень мало изменилась ТНС обнаруживается в моче. В одном из исследований сообщалось, что 0,005 процента от введенного препарата был обнаружен в моче человек четыре испытуемых до 6 часов после 30-мг дозы. Выведение метаболитов продлен в течение нескольких дней (20) Несмотря на то, метаболическое расстройство ТНС происходит очень быстро, препарат может быть обнаружен в плазме в течение по крайней мере 72 ч после однократного внутривенного введения дозы, возможно, следствием медленного высвобождения глубокого отсека, ТНС сильно связан с липопротеинов, 97 процентов от одного метода оценки, и имеет рKa сообщили 10,6 (21). Эффективная пероральная доза ТНС в организме человека составляет примерно 50-200 мкг / кг веса тела, а эффективная доза при курении составляет 25-50 мкг / кг (22).

АНАЛИТИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА

Потому что есть большой интерес в обмене веществ и фармакологии ТНС, и из-за судебных последствий ее незаконного использования, многочисленные методы были разработаны для его обнаружения и количественного определения; однако, его низкая концентрация в биологических жидкостях

и потенциальные помехи от эндогенных липидов создали сложные аналитические задачи. Флуориметрические методы, основанные на образовании хелатного галлия или на каннабиноиды dansylation, в то время как только качественные, были пригодны для некоторых применений, таких как обнаружение ТНСА в слюне курильщиков марихуаны (23-27). Количественная флуориметрическая методика сообщалась совсем недавно, в котором известное количество меченого трития ТНС добавляет к плазме в качестве внутреннего стандарта до экстракции с метиловым эфиром уксусной кислотой: петролейный эфир: этанол (66: 33: 1.5 V / V, КПД 70 процентов). ТНС и другие фенолы селективно удалены из органического экстракта с помощью экстракции со щелочным реагентом Кляйзен в. Щелочной раствор затем подкислен и повторно экстрагируют гексаном. ТНС дериватизируется обработкой ¹⁴С-меченого дансилхлорид перед очисткой с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на силианизированном пластинах с силикагелем (циклогексан: этилацетат, 95: 5 об / об). Дансильированный ТНС пятно располагается с УФ-излучением и элюировали в сцинтилляционный флакон для подсчета ³ Рука ¹⁴ С. Было обнаружено, что уровень обнаружения для этого метода равным 2,5 нг / пробирка, что предполагает чувствительность нескольких нг / мл плазмы (28).

Для периодов до 2 часов после курения, было сообщено слюна потребителей каннабиса, чтобы содержать концентрации ТНС, достаточной для обнаружения с помощью двумерной тонкослойной хроматографии с масс-спектрометрическим софтвером. В исследовании, в котором сравнивал плазму и слюну концентрации ТНС в одних и тех же предметах, препарат был обнаружен в слюне менее чем 30 мин после курения и продолжал быть обнаружено в слюне, даже после того, как он больше не мог быть обнаружен в плазме (29) , Новый дериватирующий реагент (2-п-chlorosulfophenyl-3-phenylindone), который, как сообщается, быть более избирательным, чем дансилхлорид был использован в сочетании с ТСМ, чтобы обнаружить ТНС и некоторые из его метаболитов в концентрации в сыворотке крови, как низко как 0,2 нг / мл (30). Now- когда-либо, флуоресцентное производное ТНС неустойчива и должна быть ментально измеряемым в течение нескольких минут после того, как она формируется на пластине ТСХ. Некоторые из первых методов, используемых для ТНС количественному в фармакологических и метаболических исследованиях, связанных радиоактивно меченные трейсер вводили добровольцев. Даже незначительные количества каннабиноидов продуктов метаболизма меченого ТНС были обнаружены с помощью сцинтилляционного счетчика следующих ТОГО. Тем не менее, введение радиоактивных веществ в человеческие субъект имеют потенциальные опасности для здоровья, которые ограничивают использование техники (31).

Радиоиммуноанализы (RIA) были разработаны для ТНС. Они имеют преимущество сравнительной скорости и удобства для клинического применения. Это потому, что они подходят для одновременного скопического анализа многократных проб, часто без предварительной очистки. При благоприятных условиях, чувствительность примерно 2 нг / мл могут быть достигнуты. Тем не менее, из-за переменные, присущие при получении реагентов с помощью серологических процедур, РИА испытывает недостаток в точности других методов. В попытках максимально увеличить специфичность и средство антител, различные производные ТНС были использованы в качестве гаптенов, чтобы быть конъюгирован с белком-носителем. Они включали гемисукцинат эфира (32), производное azobenzoic кислоты (33),

N-oxysuccinimidoyl эфира (34), 10-йод-9-uriedo связаны THC (35), и 0-карбоксиметилцеллюлозу производное (36). Несмотря на то, анти- тела, вызываемое эти конъюгат являются высоко специфичным для 3-кольца каннабиноидов ядра, перекрестные реакции с другими cannabi- noids, как природные, так и метаболическим, не были устранены. Это может быть преимуществом в случае исследований мочи, где unmetabo- lized THC практически отсутствует. Высокая степень неспецифического связывания THC для липопротеинов является технической проблемой в RIA, но

0,1 процента Тритон X-405 был обнаружен, эффективна солюбилизацией THC в водной среде для анализа, и стадия экстракции этанола, как была показана, чтобы обеспечить > 92-процентное восстановление THC из плазмы при удалении белкового материала путем осаждения (32). Другие RIA были разработаны для измерения THC и основных мета- bolite II (карбоксии-THC) и используется для определения относительной концентрации THC и карбоксии-THC в моче и плазме курильщиков конопли (37).

Для того, чтобы повысить специфичность метода RIA, высокой про- изводительности жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) была использована для отделения THC от других каннабиноидов, которые могут присутствовать в образце плазмы (38). Метод ВЭЖХ-РИА сообщается для измерения THC в плазме концентра- ции, как низко как 0,1 нг / мл.

Другой иммунологический метод, анализ EMIT (на основе inhi- bition ферментов пути антигипны антителами, когда ферменты ковалентно связаны с соответствующим гаптенем) был адаптирован для THC и карбоксии-THC в моче, используя отношение дегидрогеназы. Гаптен синтезируют для использования в системе EMIT вызвало антитело, которое сильно реагирует с карбоксии-THC, в отличие от антител, зывалось ранее произведено с другими THC гаптенем. Антисыворотки были там- передние подходят для общего скрининга для THC и его метаболитов (39). Рекомендуется отсечка для представления обнаружения CAN- nabinoids составляет 20 нг / мл.

Другой подход заключается в использовании газовой хроматографии (ГХ), чтобы отделить THC от других компонентов в плазме. Нормальный чув- ствительность ОГО с использованием пламенно-ионизационного детектора (ПИД) является слишком низкой, чтобы быть использована для анализа в естественных условиях плазмы. Однако захват электрона также детекторы (ECD) необходимая чувствительность при условии, что THC преобразуется в подходящую производную. Производная pentafluoropropionate является удовлетворительным для этой цели; она позволяет обнаруживать в таких низких концентрациях, как 2 нг / мл. Тем не менее, дериватизация реакция относительно неспецифической; Поэтому биохимические интер- ференции скомпрометировать селективность. Методика тандем-колонки ГХ можно использовать для достижения большей специфичности; например, THC был обнаружен в крови, как heptafluorobutyrate на системе ОИ колонки с использованием тандемной hexahydrocannabinol в качестве внутреннего стандарта. Первый столбец (5 процентов SE-30) при условии, внутренняя очистки и второго, капиллярная колонки с покрытием OV-17, достигнут потребовавшим разрешение. Методика обладает тем преимуществом, что позволяет программировать температуру в первой колонке, что позволило увеличить скорость и эффективность, но не нарушать ответ базовой линии детектора захвата электронов. Чувствительность сообщалась побио- логических образцов составляла 1 мкг вводили в колонку (40).

В дополнение к улучшенной чувствительности детектора, дериватизации ТНС может также улучшить хроматографическое поведение, блокируя полярные фенольные группы. ТНС производные, которые были подготовлены для этой цели включает триметилсилила, трифторацетил, ацетил, хлориды hoacetyl и производные трет-бутилдиметилсилили. Последнее именем было показано, демонстрирует высокую степень устойчивости к воздействию влаги и основаниям (41).

Каннабиноиды также были превращены в их диэтиловый эфиры фосфорной кислоты и анализировали методом газовой хроматографии с использованием азотно-фосфорного детектора (GC-NPD). Разработчики этого анализа рекомендуют его для рутинного количественного анализа каннабиноидов во всех токсикологических лабораторий (42). Процедура использует n-гептил гомолог

Δ^9 -ТНС в качестве внутреннего стандарта и способен де-

Пределы detection от 0,5 нг / мл в крови и 10 нг / г в ткани головного мозга. Для анализа мозговой ткани спины экстракция в метанольную базу служит для разделения каннабиноидов от вмешательства endogenous- NOUS липидов.

ВЭЖХ было использовано для разделения ТНС от других каннабиноидов и липидов в биологических жидкостях до анализа метода ОГО-ECD. Ре-фазовой ВЭЖХ куплет элюирование 47 процентов ацетонитрила в воде, а также с нормальной фазой ВЭЖХ с 25 процентов хлороформа в гептане, было установлено, чтобы отделить ТНС от его активного 11-гидрокси метаболита (III). Resolot ион

Δ^9 -а также Δ^9 -ТНС была достигнута с 5 ослабленным процентов тетрагидрофурана в гексане (43). ГХ-анализ-ЭКД пента- fluorobenzylated Δ^9 -очистка с использованием ВЭЖХ ТНС имел чувствительность

1 нг / мл плазмы, в то время как радиохимический анализ ВЭЖХ выделенной фракции имели чувствительность 0,2 нг / мл плазмы. Для количественного определения ТНСА в плазме в pharmacokinetic исследований, известное количество меченного ТНС было добавлено в качестве внутреннего стандарта либо в плазму или экстракт гептана. Это позволило рассчитать экстракции и / или сбора ВЭЖХ эффективности для сложившегося биологического образца (44).

Методика плазменной хроматографии была применена к detection из de- ultratrace количеств ТНС в GC сточных водах. Поло- TIVE спектр мобильности ТНС показывает сильный, один пик с $K_o = 1,06$. Пик приписывается протонированной молекулы иона ТНС (45).

ГХ анализ / МС с использованием метода, выбранного мониторинга ионной силе тока gently является наиболее надежным методом измерения очень низких концентрациях ТГК в плазме крови после курения. Первый ГИ метод / МСА для количественного анализа ТНС в крови был сообщен в 1973 году (46). Способ включает добавление дейтерированного аналога ТНС в качестве внутреннего стандарта и очистки экстракта с помощью жидкостной хроматографии на колонке с Сефадексом LH-20 колонке. Оригинальная процедура была позже повторно оштрафован до того, что концентрации в плазме, как низко как 0,3 нг / мл может быть измерена. Чувствительность была обнаружена ограничиваться небольшим количеством недеийтерированных ТНС загрязняющих внутреннего стандартом, так что наилучшие результаты были достигнуты с 2 ЧАС-7. Аналоговый (47).

Из-за очень небольшое количество ТНС и 11-гидрокси-ТНСА, которые появляются в человеческой плазме и моче, основной метаболит (карбокси- ТНС) является кандидатом для аналитических исследований как метод для идентификации пользователей конопли. Концентрация карбокси-ТНС в плазме превышает ТНС в течение 50 мин после курения, а затем остается выше в течение более 24 часов. Модификация выше ГХ / МС анализа для ТНС был применен для идентификации и оценки ca^2+ - квадратным метаболита. Извлечение из плазмы или мочи было с диэтиловым эфиром (восстановление 85 процентов из плазмы, 90 процентов из мочи), с последующим двухступенчатый дериватизацией, который включает esterifica- ние карбоксильной группы с диазометаном и trimethylsila- ции фенольных гидроксильной группы. Силилировали метиловый эфир **в- изомер карбокси-ТНС был использован в качестве внешнего стан- Dard, поскольку оба изомера** имеет одинаковые времена удерживания, но дифрактометр интенсивности ferent ионов в их массах-спектрах. В этом предварительном исследовании, чувствительность в диапазоне от нескольких нг / мл была указана (48). Анализ на ГХ / МС для ТНС в крови курильщиков марихуаны было сообщено что основано на химии фенольной группы, общей для всех каннабиноидов и их метаболитов; в основе методики очистки является селективной экстрагируемость липида растворимых фенолов из гексана с помощью щелочи Кляйзена в. После обратной экстракции в водном каустической, гидроксид trimethylanilinium был использован для на колонке-метилирования группы фенольной. T₁₅deuteromethyl эфир ТНС легко синтезирован для использования в качестве внутреннего стандарта, но тот факт, что это был, по необходимости,

Процедура экстракции щелочи Кляйзена была также использована в Ана- лиз активного метаболита, 11-гидрокси-ТГК в плазме (50). В этом случае, гидроксид tetrahexylammonium и этилиодид были использованы для алкилирования фенольной группы метаболита. Последующее три- methylsilylation алифатической гидроксильной группы представили deriv- ческие с удовлетворительной хроматографических и масс-спектральным т правильно-х годов. Когда соответствующий pentadeuteroethyl эфир был использован в качестве внутреннего стандарта, линейный калибровочный график был достигнут в диапазоне от 7 до 120 нг / мл плазмы. Процедура может быть использована для одновременного определения как ТНС и 11-гидрокси-Ме- tabolite в плазме (51).

ГХ / МС был адаптирован к автоматизированной системе с помощью компьютера управляемого Olfax II спектрометра и алгоритм «вероятности на основе соответствия», для измерения ТНС в качестве триметилсилили производный в экстрактах гигиенического droyzed человеческой мочи, а также для идентификации и измерения метаболитов. Процедура показала обещание как средство повышения скорости и удобства ТНС анализов, в то время как сообщается, сохраняя при этом спе- cificity селективного мониторинга ионов (52).

В Фармакокинетические исследования ТНС и 11-гидрокси-ТГК в плазме человека, результаты ГХ / МС (как электронный удар и химическая ионизация) сравнивали с таковыми из GC-ECD и процедур ТСХ-мечена на тех же образцах.

В процедуре CI ТНС был deriv- atized с пентафторпропионовым ангидридом, и pentafluoro-

пропионат эфира hexahydrocannabinol был использован в качестве внутреннего стандарта. Эндогенные плазменные компоненты не мешали, поэтому очистка предварительная хроматографическая не требуется. В процедуре EI Сефадексом LH-20-хроматографии использовали прежде, чем ГХ / МС, но ТНС не дериватизированный. Фармакокинетические данные для человека добровольцев влажности от предметов были в разумном согласии для трех методов (53).

Дальнейшие уточнения ГХ / EI-MS методики ТНС включали использование ТНС-2 ЧАС₃ в качестве внутреннего стандарта и извлечения ТНС из плазмы с чистым гексаном, чтобы избежать необходимости предварительной очистки chromatographic. Более полярные каннабиноиды остаются с плазмой; Поэтому экстракция гексана не будет пригодна, когда де-терминация метаболитов необходима. Оба CI и EI Methods имели пределы обнаружения около 0,5 нг / мл в клинических образцах, хотя режим EI (фокусировка исключительно на m / Z 314 и 317 и не требующий стадии дериватизации) было сообщено, чтобы иметь более четко определить линейность на калибровочные кривые, чем ДИ метана Me-ТПК (54).

Сочетание ВЭЖХ с МС также сообщалось для скопического анализа ТНС в жидкостях организма. На колонку с силикагелем была запрограммирована на градиентное элюирование с использованием смеси гептана и метилхлорида. Фракции элюента, собирают и вводят путем прямого зонда в **масс-спектрометр. ТНС-2 ЧАС₃ был добавлен в жидкости организма и служил в качестве внутреннего** стандарта, маркер для отходящего из коллекции ВЭЖХ (обнаруженного с помощью ультрафиолетового спектрофотометра), а также в качестве носителя для ТНС. Метод был использован для анализа концентрации ТНС в крови человека, дыхание, слюны, желчи и postmortem-ткани мозга TEM.

Было показано, что воспроизводимость, точность и линейна в диапазоне 2,5-100 нг / мл плазмы. Положительный, статистически значительная концентрация ТНС была обнаружена в слюне курильщиков марихуаны в первый час после курения (55). Система хроматографической бумаги, которая использует метанол в качестве подвижной фазы обычно отделяет каннабиноиды от большого количества эндогенного липидного материала, присутствующего в хлороформе экстрактах образцов крови. Область бумаги вблизи фронта растворителя элюируют метилхлоридом и каннабиноиды идентифицированы с помощью ГХ / МС. Если от 15 до 25 мл цельной крови доступны, / мл могут быть обнаружены из концентраций, ТНС как низко как 0,5 нг. Для количественного анализа TIVE 2,3,4,6-tetrachlorophenyl гексилевого эфира предлагаются в качестве внутреннего стандарта. В соответствии с ГХ / МС условия, используемые (3 процента пер-ОV-1, ЭИ) тетрахлор эфир имеет время удерживания 0.45 по отношению к ТНС и производят ионы фрагментов при тех же номинальные массы, как некоторые из ионов известных фрагментов ТНС в. Же повторно порт указывает на потенциал для пиролитической конверсии ТНС к каннабинола в ГХ и ГХ / МС анализа. Термическое разложение ТНС сведено к минимуму, сохраняя все температуры GC и MS к минимуму в соответствии с удовлетворительной хроматографией (56).

Растворители, используемые для экстракции ТНС из биологических образцов in-гексан заключить, при нейтральном pH (52, 53); гексан + 5 процентов изоамиловый спирт (49); петролейный эфир, иногда содержащие 0,5 процента

изоамиловый эфир или 1,5 процента изопентанол (47,53,55); гептана со- Taining 1,5 процента изоамилового спирта (21,40,57); и петролейный эфир: этилацетат (2: л) (29). Восстановление свыше 90 процентов из плазмы было зарегистрировано для гептана: изоамиловый спирт (40); хлор- форма извлечения цельной крови дал восстановление THC 86 процентов (56).

Труды симпозиума по анализу каннабиноидов в физиологических жидкостях, проведенных в 1977 году, были опубликованы и обеспечить хороший обзор последних исследований в этой области (58). Кроме того, На- онный институт по борьбе со злоупотреблением наркотических средств является спонсором два конференций по анализу каннабиноидов в физиологических образцах. Труды первой конференции, состоявшиеся в 1976 году, были опубликованы в качестве NIDA Research Монографии (59). Труды второй ской конференции, состоявшейся в январе 1980 года, будут опубликованы позднее в этом году (60).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОЦЕДУРА

Два метода описаны, один для анализа THC в цельной крови или плазмы, а другой для анализа метаболитов, 11-гидрокси- THC и 9-карбокси-THC, в крови, плазме и моче. Первый мне- ThOD включает в себя извлечение жидкости организма с гексаном, неполярным, относительно селективного растворителя для экстракции. Очень липофильный THC эффективно экстрагируют гексаном, а полярные метаболиты плохо извлечены. Второй метод использует более пол рный extras- Тион растворитель (гексан: этилацетат, 7: лв / об), который удаляет Me- tabolites из жидкости организма, но, к сожалению, также извлекает эндогенные компоненты, которые мешают при измерении низких концентраций (<10 нг / мл) THC. Колонна стеклянных капиллярные АЯ была использована для решения триметилсилилировало THC из эндогенных компо- нентов (61), но усилия по разрешению интерференцию с использованием насадочных колонн GC до сих пор не увенчались успехом. Это причина, почему два аналогичные, но отдельные процедуры используются для количественного THC и два метаболитов.

Стандарты и реагенты

Все каннабиноидов стандартов, используемых при разработке метода, описанного здесь, были получены из Research Triangle Institute, Research Triangle, NC, 27709, через Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами. Чистота и изотопный состав данные приведены ниже:

Δ^9 - Тетрагидроканнабинол (THC)

Чистота: 98,7 процента по данным ГХ

5^1 - 2 ЧАС 3 - 9 - Δ^9 -тетрагидроканнабинол (THC- 2 ЧАС 3)

Чистота: > 95 процентов по данным ОГО, 100 процентов по ТОМУ изотопному составу: 2 ЧАС 3 , 96,6 процента; 2 ЧАС 2 , 2,6 процента; 2 ЧАС 1 , 0,77 процента; 2 ЧАС 0 , 0 процентов.

11-гидрокси- 9 - Δ^9 -тетрагидроканнабинол (11-ОН-THC)

Чистота: > 98 процентов по данным ГХ, как бис (триметилсилил) эфира, 100 процентов с помощью ТСХ

5'-2 ЧАС з. 11-гидрокси-^Δ тетрагидроканнабинол (11-ОН-ТНС-2 ЧАС з)

Чистота: > 95 процентов по данным ОГО, как бис (триметилсилил) эфир, 100 процентов по **ТОМУ изотопному составу: 2 ЧАС з 95,8 процента; 2 ЧАС 2, 2,4 процента;**
2 ЧАС 1, 1,1 процента; 2 ЧАС 0, 0 процентов

11-Nor-9-автомобиль-боху-^Δ тетрагидроканнабинол (9-карбокси-ТНС)

Чистота: 97 процентов по данным ГХ, как бис (триметилсилил) эфир, 100 процентов с помощью ТСХ

5'-2 ЧАС з. 11-нор-9-карбокси-^Δ тетрагидроканнабинол (9-карбокси-ТНС-2 ЧАС з)

Чистота: 100 процентов по данным ОГО, как бис (триметилсилил) de^r-ivative, 100 процентов по ТОМУ изотопному составу:
2 ЧАС з. 95,8 процента; 2 ЧАС 2, 2,4 процента;
2 ЧАС 1, 1,1 процента; 2 ЧАС 0, 0 процентов.

Буферные растворы pH 2,0 и pH 7,0, были приобретены у Fischer Scientific Company.

N, O-бис- (триметилсилил) трифторацетамид (БСТФА), содержащей 1 процент триметилсилилхлорид был приобретен у Pierce Company чешских хемадсорби-, Rockford, IL, 61105. Реагент хранили при -10 ° C, но оставляли нагреваться до при комнатной температуре, прежде чем аликваты были повторно перемещены для дериватизации.

чистый ^Δ ТНС представляет собой бесцветный, вязкий сироп.

Именно поэтому диф-

ficult для передачи и точного взвешивания небольших количеств.

^Δ Стандарты ТНС, описанные выше, были получены в виде спиртовых растворов заданных концентраций, а затем были герметично фиксируют метанолом с получением маточных растворов с концентрацией ТНС 0,10 мг / мл. Конечно, концентрации не должны быть точно 0,10 мг / мл, но они должны быть точно известны. Концентрация ТНС Исходный раствор 0,10 мг / мл используется в данном описании экспериментальной лишь в качестве примера.

11-ОН-ТНС, и 9-карбокси-ТНС являются твердыми при комнатной температуре. Поскольку эти два метаболита измеряются в то же время в биологических образцах, один исходный раствор, содержащий 0,10 мг / мл каждого из метаболитов в метаноле, могут быть получены, а также один исходный раствор, **содержащий 0,10 мг / мл каждого из deu- terated аналоги (11-ОН-ТНС-2 ЧАС з и 9-автомобиль-квадратный-ТНС-2 ЧАС з) в метаноле. Они могут быть приготовлены путем взвешивания в** 100-мл мерную колбу 10 мг 11-ОН-ТНС и 10 мг 9-карбокси-ТНС, и весом во второй 100-мл мерную колбу 10 мг каждого из дейтерированных аналогов. Добавляют приблизительно 75 мл метанола в каждую колбу. После того, как твердые вещества растворились добавить дополнительный метанол в колбы, чтобы довести каждый раствор до 100 мл ровно. Серия рабочих стан- Дарда решения недейтерированных каннабиноидов может быть получена путем соответствующего разбавлением исходных растворов, как описано в главе 2.

Для измерения ТНС или 11-ОНА-ТНС и 9-карбокси-ТНСА в биологических жидкостях в диапазоне концентраций от 1 до 500 нг / мл, добавление приблизительно 40 нг / мл каждого из соответствующих дейтерированных входов

твенные стандарты на каждые мл образца удовлетворительные. Это может быть удобно сделать путем добавления 100 μ л из / мл метанольного раствора 400 нг ТНС-2 ЧАС₃ или 11-СМ-ТНС-2 ЧАС₃ и 9-карбокситНС-2 ЧАС₃ чтобы каждый мл жидкости тела. Подготовьте / мл внутреннего стандарта растворов 400-нг путем разбавления 1 мл 0,10 мг / мл исходного раствора до 250 мл метанола.

Каннабиноиды, особенно ТНС, неустойчивы при воздействии света (4,62), кислорода (4), кислоты (21), и / или повышенные температуры (62). Следовательно, хранить запас и стандартные решения в полном объеме, закупоренных или заблокированных стеклянных сосудов в темноте при температуре ниже 0 ° С. В концентрации маточных растворов должны быть проверены по крайней мере каждые три месяца. Это может быть сделано путем добавления известного количества внутреннего стандарта, такого как

Δ^4 -андростен-3,17-дион к аликвоте

исходный раствор, а затем анализ раствора с помощью газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором. Если концентрация саппаби-Ноид решения изменилось детектируемым количеством, новый калибровочный график должен быть установлен для этого исходного раствора.

ТНС имеет сильную тенденцию прилипнуть к поверхности стекла (21). Это адсорбция может привести к ухудшению чувствительности и точности, но может быть сведена к минимуму с помощью чистой, силианизированы стеклянной посуды для образца экс-тяг (63).

Извлечение ТНС из плазмы или цельной крови

Передача измеренного количества (обычно 1 мл) плазмы или цельной крови в 20-мл пробирку, снабженную тефлоновой футеровкой завинчивающейся крышкой. Добавьте 100 мкл / мл раствора метанола, 400 нг ТНС-2 ЧАС₃

внутренний стандарт, и вихрь в течение 10 сек. Дайте образец equil-ibrate в течение 15 мин. Добавьте 1 мл pH 7,0 буферного раствора и 6 мл гексана. Закрывает пробирку плотно и осторожно перемешать содержимое в течение 30 мин с использованием автоматического коромысла трубки или ротатора. Центрифуга в течение 5 мин и затем осторожно переносить только слой гексана (сверху) во вторую культуральную пробирку с помощью одноразового пипетки Пастера. Остаток повторно maining плазма может быть отброшен. Раствор гексана теперь последовательно промывают разбавленной щелочи и разбавленной кислотой, чтобы повторно перейти сильно кислотные и основные соединения. Добавьте 2,5 мл 0,1 н раствора NaOH в экстракт гексана. После того, как закупорки трубки, RO- Tate или рока в течение 30 мин, а затем центрифуги. Использование другой дис-posable пипетки, удалить водный слой (нижний) и выбросить. Добавьте 2,5 мл 0,1 н раствора HCl в экстракт гексана. Нажмите на трубку осторожно, чтобы пузырьки газа, образованные кислотной-щелочной реакции, чтобы избежать. Опять же, увенчать трубку плотно, рок или повернуть его в течение 30 мин, и центрифуга. Аккуратно перенести только слой гексана (сверху) в 15-мл стеклянной трубки с коническим или конусообразным дном. Концентрат экстракта почти досуха при температуре 35-40 ° С при слабом токе азота. Остаток экстракта теперь переносят в коническую стеклянную пробирку емкостью 1 мл, снабженную Tef- Lon подкладке винтовой крышкой следующим образом. Добавьте 0,5 мл гексана в пробирку, содержащую остаток и вихревые трубки в течение 10 сек. Пипеткой перенесите раствор в гексане, чтобы стеклянную пробирку с 1 мл. Повторите последний шаг, используя дополнительно 0,5 мл гексана, чтобы перенести оставшийся остаток экстракта до 1 мл колпачок трубки плотно, камень или повернуть его в течение 30 мин, и центрифугируют. Аккуратно перенести только слой гексана (сверху) в 15-мл стеклянной трубки с коническим или конусообразным дном. Концентрат экстракта почти досуха при температуре 35-40 ° С при слабом токе азота. Остаток экстракта теперь переносят в коническую стеклянную пробирку емкостью 1 мл, снабженную Tef- Lon подкладке винтовой крышкой следующим образом. Добавьте 0,5 мл гексана в пробирку, содержащую остаток и вихревые трубки в течение 10 сек. Пипеткой перенесите раствор в гексане, чтобы стеклянную пробирку с 1 мл. Повторите последний шаг, используя дополнительно 0,5 мл гексана, чтобы перенести оставшийся остаток экстракта до 1 мл колпачок трубки плотно, камень или повернуть его в течение 30 мин, и центрифугируют. Аккуратно перенести только слой гексана (сверху) в 15-мл стеклянной трубки с коническим или конусообразным дном. Концентрат экстракта почти досуха при температуре 35-40 ° С при слабом токе азота. Остаток экстракта теперь переносят в коническую стеклянную пробирку емкостью 1 мл, снабженную Tef- Lon подкладке винтовой крышкой следующим образом. Добавьте 0,5 мл гексана в пробирку, содержащую остаток и вихревые трубки в течение 10 сек. Пипеткой перенесите раствор в гексане, чтобы стеклянную пробирку с 1 мл. Повторите последний шаг, используя дополнительно 0,5 мл гексана, чтобы перенести оставшийся остаток экстракта до 1 мл колпачок трубки плотно, камень или повернуть его в течение 30 мин, и центрифугируют. Аккуратно перенести только слой гексана (сверху) в 15-мл стеклянной трубки с коническим или конусообразным дном. Концентрат экстракта почти досуха при температуре 35-40 ° С при слабом токе азота. Остаток экстракта теперь переносят в коническую стеклянную пробирку емкостью 1 мл.

Флакон. Добавьте 10 μ l диметилформамида в раствор гексана, чтобы действовать в качестве «хранителя», чтобы свести к минимуму испарительную потерю THC во время окончательного испарения и служить в качестве растворителя для триметило силилирование. Медленно концентрирует раствор гексана путем нагревания стеклянного пузырька в нагревательном блоке, поддерживаемом при 40 ° C. Когда все гексана испарится (примерно 20 мин), добавляют 15 μ l бис (триметилсилил) трифторацетамида, содержащей 1 процент триметилсилилхлорид во флакон и крышка плотно. Вихревой флакон и затем нагревают в сушильном шкафу при 75 ° C в течение 1 часа. для анализа GX / MS, но это может быть

Образец, теперь готовы хранить при температуре от -10 ° C до бесконечности.

GX / MS анализ THC-TMS

Экспериментальные условия для анализа GX / MS THC заключаются в следующем:

ГХ колонок:	1,8 м x 2 мм стекла нной колонка упакована с 3 процентами OV-17 на 100/120 меш Газ Chrom Q (Прикладные науки Лаборатория, State College, PA 16801)
Газ-носитель:	Метан, 15-20 мл / мин
Реагент газ:	Аммиак вводят в ионную камеру, как описано в главе 2
Температура:	Инжектор, 280 ° C Колонка, от 190 до 310 ° C при 20 ° / мин линии GX / МС переноса, 280 ° C Источник ионов, 160 ° C

В этих условиях THC-TMS должны элюировать из газа хроматографе matograph при температуре от 2 до 5 мин.

До начала GX / MS анализ образцов, производительность общей системы GX / MS должна быть оценена и оптимизирована, как описано в главе 2. Ионы, подлежащих мониторингу являются **прото-ионы молекулы для NAT, THC-TMS (м / г 387) и THC-2 ЧАС-3- TMS (м / з**

390). С отбракованных клапана в положении отбракованных, вводят органический экстракт в газовый хроматограф (от 2 до 8 μ l). Примерно через 1 мин, переключить отбракованный клапан таким образом, что весь поток газа-носителя поступает в источнике ионов масс-спектрометре, и начинают сбор данных. Когда пики THC-TMS уже элюировало, прекращает сбор данных и вернуть отбракованный клапан в положение переадресации.

Количество THC в биологическом образце образца опре- добыто путем измерения высоты (или зоны) на THC-TMS и THC-2 ЧАС-3- TMS пики профилей тока, выбранный иона («ион chroma- tograms») и соотношение отношения высот пиков к калибровочной графике. Вычислить концентрацию жидкости организма THC путем деления измеренного количества THC точным объемом образца подвергался анализу.

Добыча метаболита из крови, плазмы или мочи

К 1 мл образца (кровь, плазма или моча) в 20-мл пробирку, снабженную тефлоновой футеровкой винтовой крышкой, добавить 100 μ l в виде Me- thanol раствора, содержащего 40 нг каждого из **внутренних стандартов, 11-ОН -ТНС-2 ЧАС₃ и 9-карбокси-ТНС-2 ЧАС₃ (Концентрация, 400 нг / мл). Vortex** трубки в течение 10 сек и позволяют образец для уравнивания в течение 15 мин. Добавить 1 мл буфера pH 2 и 4 мл смеси гексан: этилацетат растворитель (7: 1 об / об).

Привинтить крышку на трубе плотно и проверить на наличие утечек. Медленно вращать или раскачивать трубку в течение 15 мин. Ослабьте крышку, а затем центрифуге. С помощью пипетки Пастера одноразового использования, передавать органический слой (вверху) на вторую культуральную пробирку и дис- карты водный слой плазмы. **Добавляют 2 мл 0,2 NH₂ ТАК₄ к или- экстракта Ганич. Винт на крышке, затяните и снова проверить на наличие** утечек. Повторите качалки (15 мин) и центрифугированием (5 мин). Перенести органический слой (вверху) в центрифужную пробирку, по меньшей мере, 10 мл по объему. Старайтесь не передавать какие-либо из водной (нижний) слой в центрифужную пробирку. Удалите водный слой. Концентрат экстракта почти досуха при нагревании до 35-40 ° C при слабом токе азота или отфильтрованного воздуха. Мытье вниз стороны трубки с 0,5 мл хлористого метилена. Вихревые трубки и передачи экстракта в 1-мл стеклянный флакон, который имеет сопе- формованного дно и тефлоном винтовой колпачок. Опять же моют вниз стороны центрифужной пробирки с другими 0,5 мл метиленхлорида и переносит стирку растворителя к тому же флакону 1 мл стекла.

Выпаривают объединенные растворители при нагревании до 30-40 ° C в слабом потоке азота или отфильтрованного воздуха, пока все хлористого метилена больше нет (около 20 мин). Добавьте 50 μ l бис- (триметилсиллил) трифторацетамида, содержащей 1 процент триметилсиллилхлорид в ампуле; крышка плотно и нагревают при 90 ° C в течение 1 часа. Образец готов для анализа ГХ / МС.

При необходимости он может быть

хранится в морозильной камере, пока она не должна быть проанализирована; Однако, убедитесь, чтобы флакон нагреться до комнатной температуры перед снятием крышки, чтобы снять материал для инъекций в ГХ / МС. Trime- thylsilylated 9-карбокси-ТНС является особенно уязвимым для гидролиза. Следовательно, воздействие дериватизированного экстракта к воздуху должно быть сведено к минимуму, а при длительном хранении следует избегать.

ГХ / МС анализ 11-ОН-ТНС-TMS и 9-карбокси-ТНС-TMS

Экспериментальные условия для ГХ / МС анализа дериватизированных метаболитов ТНС являются следующие:

ГХ колонок:	1,8 м x 2 мм стекл нной колонке упакованы с 3 процента OV-17 или 100/120 меш Газ Chrom Q (Прикладные науки Лаборатория, State College, PA 16801)
Газ-носитель:	Метан, 15-20 мл / мин
Реагент газ:	Аммиак, вводится в ионную камеру, как описано в главе 2

Температура: Инжектор, 280 ° С
Колонка, от 190 до 310 ° С при 20 ° / мин линии ГХ /
МС переноса, 280 ° С Источник ионов, 160 ° С

В этих условиях 11-ОН-ТНС-ТМС должны элюировать из GC около 3 мин, и 9-карбокси-ТНС-ТМС при температуре около 4,5 мин.

Ионы, которые будут отслеживаемые являются ионы протонированной молекулы для 11- ОН-ТНС-ТМС (м / з 475), 11-ОН-ТНС-2 ЧАС-з ТМС (м / з 478), 9-карбокси-ТНС- ТМС (м / з 489), и 9-карбокси-ТНС-2 ЧАС-з ТМС (м / з 491). С отбракованных клапана в положении отбракованных вводят от 2 до 8 мкл триметил Силилированный экстракта в ГХ / МС. Примерно через 1 мин переключить отбракованный клапан таким образом, что весь поток газа-носителя поступает в источнике ионов. Лучшая чувствительность достигается за счет первого мониторинга только ионные токи при м / з 475 и 478 до тех пор, 11-ОН-ТНС-ТМС имеет элюируют из GC; затем контролировать ионные токи при м / з 489 и 491 до тех пор, 9-карбокси-ТНС-ТМС имеет элюируют. Если система данных ГХ / МС не допускает быстрые изменения контролируемых ионных масс, все четыре иона массы должны быть проверены в течение всего времени, необходимого для элюирования обоих метаболитов. Когда 9-карбокси метаболит элюировал, прекратить сбор данных и вернуть отбракованный клапан в положение отбракованного.

Величины 11-гидрокси- и 9-карбоксите метаболиты в био- логического образца определяется путем измерения высоты (или участков) дериватизированных метаболитов и их внутренние стандартов в текущих профилях выбраны ионными, касающиеся соотношений высот пиков для калибровочные графики (Глава 2). Вычислить концентра- ции 11-гидрокси- и 9-карбоксите метаболитов в образце путем деления измеряемые величины этих соединений путем точного объема образца, экстрагированных.

Обсуждение экспериментальных процедур

Описано выше для количественного анализа ТНС в крови и плазме был разработан метод и уточнен в течение четырех лет. Dig- ИНГ на этот раз более 2500 образцов плазмы, представленный различными CAN- pabinoid исследователей, были проанализированы. Один из каждых шести аналитичны образцов соответствует контрольной плазмы, к которому было добавлено известное количество ТНС. Измеренные концентрации ТНС в обогащенных образцах плазмы, приведены в таблице 1.

Таблица 1. точность данных для измерения ТНС
ДОБАВЛЕНО ПЛАЗМЕ.

Подготовленные ТНС концентрация (Нг / мл)	Среднее Измеряется Концентрация \pm SD (Нг / мл)	Количество образцов Анализируются
0,92	0,88 \pm 0,39	15
1,84	1,73 \pm 0,51	18
4,60	4,75 \pm 0,89	24
9,20	9,32 \pm 0,72	22
18,4	18,85 \pm 0,45	22
46,0	47,21 \pm 1,83	21
92,0	91,97 \pm 1,92	23
184,0	176,71 \pm 1,74	13

На рисунке 1 показан репрезентативный калибровочный график, покрывающий диапазон концентраций от 0,5 до 184 нг / мл. Коэффициент корреляции для графа 0,9999.

Большинство ТНС анализов сделано в Battelle в период с сентября 1977 года и в сентябре 1979 были выполнены на GC Финнигэна 4000 / MC, соединенной с системой данных INCOS. С система работает в нормальном режиме, так же мало, как 20 пг дериватизированного ТНС вводили в ГХ / MC дал ответ достаточную, чтобы обеспечить измерение с хорошей точностью. Как правило, только от 10 до 20 процентов из дериватизированного экстракта мичешей в одно время. Следовательно, для 1 мл образца плазмы, концентрации от ТНС как низко как 0,2 нг / мл могут быть измерены. Один техника мог извлечь и подготовить набор 36 плазмы образцов на для анализа в течение 8 часов. Еще 8 ч была потребовавшая для выполнения ОГО / MC анализа.

Преимущества использования масс-спектрометрии CI с метаном и аммиачный в качестве газообразных реагентов очевидны на рисунке 2 и в таблице 2. Рисунок 2 сравнивает масс-спектр EI из триметилсилили deq- vative ТНС с соответствующими Масс-спектры с использованием либо ДИ метан или комбинация метан-аммиак в качестве газа-реагента.

В

Спектр масс-ДИ метан-аммиак почти весь ТНС ионного тока концентрируется на одной массы ионов, соответствующий прото молекулы иона за NAT (m / z 387). Чувствительность, достигнутые ионного вольно выбранной мониторинга анализа конкретных количеств ТНС сравниваются в четвертой колонке в таблице 2. Использование метана и AM-

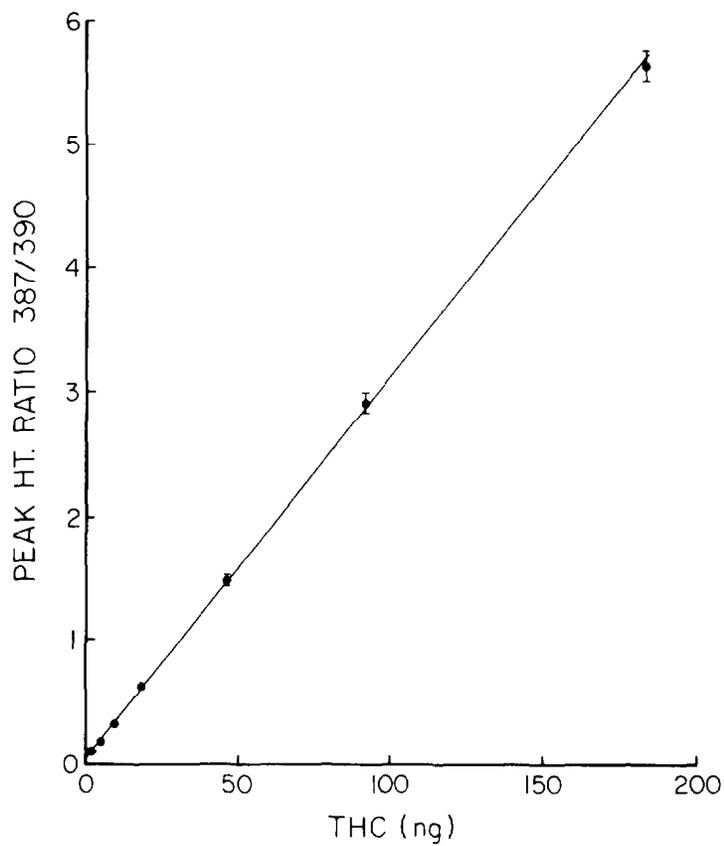


РИСУНОК 1.

Калибровочный график ДЛЯ АНАЛИЗА THC В ПЛАЗМЕ

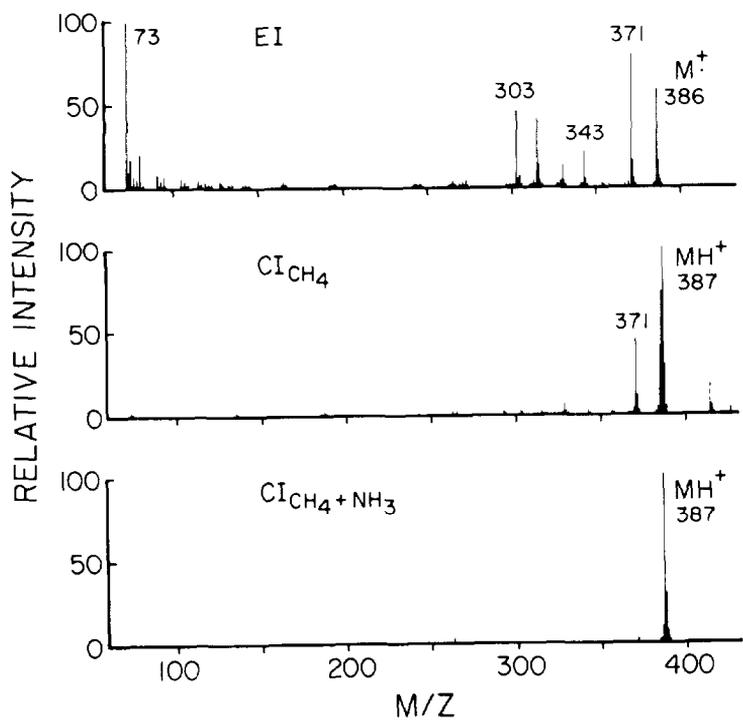


Рисунок 2. Масс-спектры триметилсилилировали THC

Моня дает наибольший сигнал на единицу массы THC. Более того, фактическое отсутствие фрагментарных ионов под метан-аммиак химической ионизации означает, что есть меньше шансов интерференция ионами из других компонентов экстракта.

Таблица 2. Относительные ОТВЕТЫ ДЛЯ КРУПНЫХ ИОНОВ НА ЭИ
И ДИ масс-спектры триметилсиллил ЭФИРА THC

Ионизация метод	м / г <u>контролируемый</u>	Процент Образцы <u>ионный ток</u>	Относительный ответ На единицу веса THC
EI	386 (M +)	7	50
ДИ (СН ₄)	387 (MH +)	24	20
ДИ (СН ₄ • Нью-Гемпшир ₃)	387 (MH +)	67	100

Эффективность протонирование THC-TMS под метан-аммиак хими- ческие условия ионизации было неожиданным, так как молекула THC не содержит основной атом азота. Тем не менее, по-видимому, в газовой фазе THC и его производного TMS обладают высокой протонной аффин- ностью. То же самое можно сказать и о производных TMS два мета- bolites, как показано обильных ионами протонированных молекул, наблюдаемых в их метане-аммиак ДИ масс-спектрах (рисунок 3).

Эффективность ионизации и селективность в отношении метана-аммиачного химической ионизации являются основными причинами, в плазме концентрации, THC как низко как 0,5 нг / мл могут быть измерены без employ- Инг, более обширной процедура очистки и экстракции образца. Тем не менее, необходимо, чтобы нагреть колонку ГХ до температур, значительно превышающих температуры элюирования THC-TMS для того, чтобы очистить колонку эндогенных соединений, таких как холестерин. Если это не будет сделано, мешающие пики будут появляться в ионном токе про- файлы, созданных с помощью последующих инъекций. Поддержание колонки при 280-300 ° C в течение ночи с нормальным потоком газа-носителя также поможет сохранить хорошую производительность столбца.

Если процедуры, описанные выше, а затем, колонка ОИ должна дать удовлетворительные характеристики в течение по крайней мере несколько сот скопического SES. Однако производительность колонны должна быть оценена каждый день до того, как анализ образцов начался. Раз- решение колонны GC может быть оценена путем введения раствора, который содержит равные смеси в THC-TMS и в THC-TMS (~ 50 мкг / мл в гексане). В соответствии с указанными условиями GC хорошим качеством

1,8-х 2 мм упакована OV-17 колонки должны дать хроматограмму, показывающие, по меньшей мере, обнаруживаемую долину между вершинами, соответствующих двум каннабиноидных производными. Чувствительность ГХ / МС может быть оценена путем инъекции 1 мкл стандартного раствора, содержа-

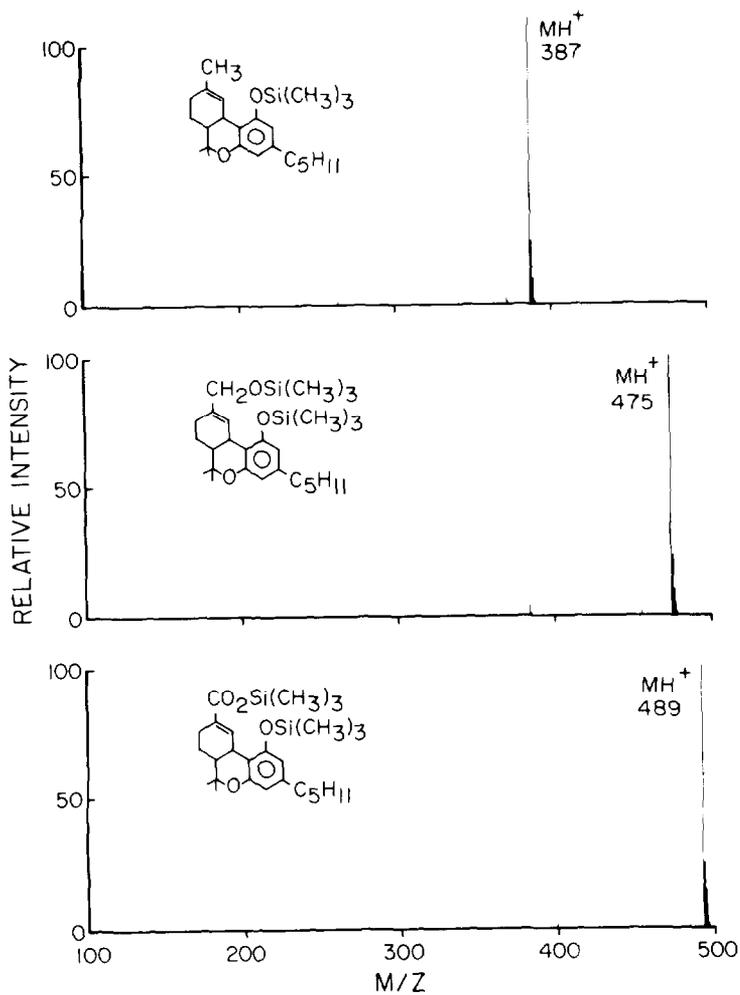


Рисунок 3. метано-АММИАКА ДИ Масс-спектры три-Метилсиллил ПРОИЗВОДНЫЕ ТНС (вверху), 11-ОН-ТНС (в центре) и 9-карбокси-ТНС (НИЗ)

ING 1 нг THC-TMS. Пик в м / г 387 ионный ток профиль, который соответствует THC-TMS должен быть симметричным и имеют отношение сигнал-шум более чем 50: 1.

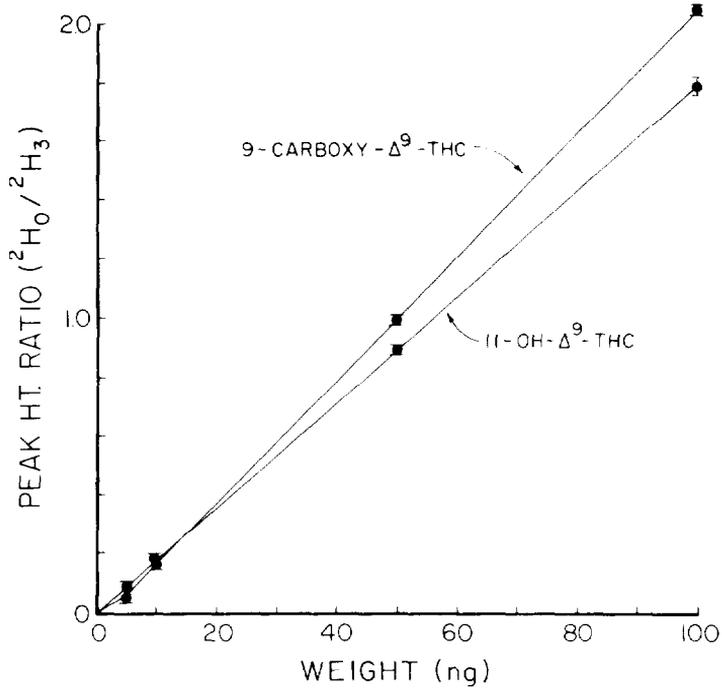
Методика, описанная выше для анализа THC метаболитов не использовались так широко, как метода THC, и, следовательно, он не так тщательно проверен. Аналогичная процедура, в которой 9-карбокси-THC был сначала превращают в ее метиловый эфир путем treat- MENT эфирным диазометаном, а затем триметилсилилировали, работал в Battelle для анализа примерно 300 образцов плазмы. На рисунке 4 показаны репрезентативные калибровочные графики, полученные в то время, были проведены эти тесты. В таблице 3 приведены анализ точность для анализа образцов плазмы, к которому была добавлена известное сгущение каждого из метаболитов.

ТАБЛИЦА 3. ТОЧНОСТЬ ДАННЫХ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ
THC МЕТАБОЛИТЫ ADDED плазменному

Метаболиты Концентрация (Нг / мл)	11-ОН-THC РСД (%)	9-карбокси-THC РСД (%)
1	7	31
5	4	7
10	2	2
50	1	3
100	3	2

Было показано, что в последнее время до 80 процентов от 9-карбокси-THC в моче курильщиков марихуаны присутствует в форме конъюгата глюкуроида (64). Остаток глюкуроновой кислоты, как представляется, быть присоединен к метаболиту с помощью сложноэфирной связи с 9- карбоксильной группой метаболита. Конъюгат не расщепляется традиционным лечением с бета-глюкуронидазы и сульфатазы, но может быть расщеплен путем щелочного гидролиза (65). Рекомендуемые кон- вия для гидролиза, чтобы добавить биологический образец к равному объему 1 М гидроксида натрия в метаноле и нагревают на паровой бане (100 ° C) в течение 12 минут. Подкислени смеси до pH 2 добавлением 1 мл 1 N серной кислоты и 1 мл буфера pH 2. Всего 9-карбокси-THC концентрация может быть определена путем экстракции смеси гексан: этилацетат, дериватизация,

Анализ THC в разлагающихся крови или тканей подарков циальных проблем пору-. Основная трудность заключается в том, что эффективность экс- вытяжений THC от разложившейся крови гексана беден и ER- ratic. Даже дейтерированный THC добавлен в кровь разложившейся как меж-



Фиг.4. Калибровочный график ДЛЯ АНАЛИЗА 11-ОН-ТНС и 9-карбокси-ТНС КАК ИХ ПРОИЗВОДНЫХ триметилсилили

NAL стандарт трудно эффективно извлекать с гексаном. Ар-димому ТХЦ связывается с биохимическими компонентами в разложенной крови таким образом, что ингибирует его удаление с помощью обычных процедур, бывших тяговых. Процедура была недавно сообщалась для количественного определения ТНС в трупной крови (66). Мне- ThOD включает в себя извлечение 3 мл крови в общей сложности 50 мл ацетона, испарения ацетона, экстракции остатка с петролейным эфиром, а затем хроматографией на колонке с Сефадексом LH-20 с последующим анализом GC / MS. Более простая процедура была разработана в Battelle для извлечения ТНС из гемолизируют и разлагают кровь (67); это дало приемлемые количественные результаты для концентраций от ТНС до 1 нг / мл для большинства партий гемолизованной крови. Тем не менее, иногда большие различия в экстракционной эффективности имели место, указывая, что метод нуждается в дальнейшем повторно refinement. Процедура состоит из того **внутреннего стандарта к 1 мл гемолизованной крови, затем 1 мл 3 NH₂ ТАК₄ и 1 мл ацетонитрила. Смесь** обрабатывают ультразвуком и полученный осадок белок удаляют после центрифугирования. Надосадочную жидкость затем нейтрализуют с помощью 3 N NaOH и 1 мл буфера pH 7,0 добавляют. Водный раствор дважды экстрагируют с помощью 6 мл HEX- ане. Остальные этапы, включающие в себя последовательные промывках экстракта гексана с разбавленной щелочью и разбавленные кислотой с последующим гущением и дериватизацией, идентичны процедурой экстракции ТНС из нормальной плазмы.

**Физические, химические и SPECTROMETIC ДАННЫЕ
ДЛЯ Δ -тетрагидроканнабинол**

Номенклатура

Химическое название: 6aR-транс-6a, 7,8,10a-тетрагидро-6,6,9-триметил
3-пентил-6H-дibenzo [b, g] пиран-1-ол

Эмпирическая формула: C₂₁ H₂₈ O₂

Количество химических веществ регистрации: 1972-08-3

Физические константы

Внешность: Бесцветный вязкий сироп

Точка кипения: 200 ° C при 0,02 мм

Удельное вращение: $\alpha_D^{20} = -150,5^\circ$ (c = 0,53 в CHCl₃)

Растворимость: Очень растворим в гексане, хлороформом и этанолом. Растворам Билити в воде, 3 мг / л

pKa: 10,6

УФ-поглощение: $\lambda_{\text{Максимум}} (\text{этанол}) = 283, 276 \text{ нм}$ (журнал E 3.21, 3.20)

**Физические, химические и спектрометрические данных для
11-гидрокси- Δ -тетрагидроканнабинол**

Номенклатура

Химическое название: 6aR-транс-6a, 7,8,10a-тетрагидро-1-гидрокси-6,6-
диметил-3-пентил-6H-дibenzo [b, g] пиран-9-метанол

Эмпирическая формула: C₂₁ H₂₈ O₃

Химический Номер регистрации: 36557-05-8

Физические константы

Внешний вид: белый, аморфное твердое вещество Температура

плавления: 139-140 ° C Растворимость:

_____ Растворим в этаноле, ацетоне. Умеренно растворим в бензоле, хлороформе.
Почти не растворим в воде, петролейный эфир

УФ-поглощение: $\lambda_{\text{Максимум}} (\text{этанол}) = 276, 282 \text{ нм}$

**Физические, химические и спектрометрические данных для
11-нор-9-карбокси-9-тетрагидроканнабинол**

Номенклатура

Химическое название: 6aR-транс-6a, 7, 8, 10a-тетрагидро-1-гидрокси-6,6-
диметил-3-пентил-6H-дibenзо [b, g] пирано-9-карбоновая кислота
автомобиль-

Эмпирическая формула: C₂₁ H₂₈ O₄

Количество химического реестра: _____ 56354-06-4

Физические константы

Внешний вид: белый кристаллический твердый

Точка плавления: 210-213 ° C

Растворимость: Растворим в этаноле, ацетоне. Умеренно растворим в хлороформе, этиловом эфире. Почти не растворим в воде, бензол, петролейный эфир

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С. Коэн в RC-Петерсен, изд. Марихуана исследования.: _____
1976. Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотических средств Исследовательской Монографии 14
DHEW Pub. (ADM) 77-501. Supt. из Docs., США правительственных служб. Распечатать. Из ф. , Вашингтон, округ Колумбия, гл.
9 (июль 1977).
2. А. Сперлинг. J. Chromatogr. Sci., 10, 268 (1972)._____
3. P. Karler в RC-Петерсен, изд. Марихуана Результаты исследования.: _____
1976, гл. 2. См ссылки 1.
4. JW Fairbairn, JA Либман, М. Роуэн. J. Pharm. Pharmacol., 28, 1 (1976). _____

5. P. Mechoulam и Y. Gaoni. Варенье. Химреагент Soc., 87, 3273 (1965). _____
6. AJ Singer, изд. «Марихуана: химия, фармакология и Модели социального использования»,
Ann. NY Acad. Sci., 191, 1-269 (1971). _____
7. P. Mechoulam, изд. Марихуана, Academic Press, Нью-Йорк и Лондон (1973).
8. WDM Патон и Дж короны. Конопля и ее производные. Oxford Univ. Press. London (1972)._____
9. RE Willette, изд., Drugs и вождение. Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотических средств
Исследовательской монографии 11, DHEW Pub. (AIM) 77-432. Supt. из Docs., США правительственных служб.
Распечатать. Выкл., Вашингтон, округ Колумбия (март 1977).

10. G. Nahas. Bull OOH. Борьба с наркотиками, 29, 13 (1977). _____
11. Л. Ли, М. Новотны, и КД Бартла. Анальный. Chem., 48, 405 (1976). _____
12. P. Karler в RC-Петерсен, изд, Марижуана исследования.: _____
 1976, гл. 3. См ссылки 1.
13. E. Leighty, A. Ф. Фентимэн, младший и RL Фольц. Местожительство Commun. Химреагент Pathol. _____
 Pharmacol., 14, 13 (1976). _____
14. P. Mechoulam, WK Маккалум, и С. Берстеин. Химреагент Rev., 76, 75 (1976). _____
15. G. Nahas, WDM Патон и JE Идапраап-Хейккиль, ред, марижуана.: Химия, биохимия, и клеточные
 эффекты. Springer-Verlag, New York (1976). _____
16. MC Брауде и С. Szara, ред., Фармакология марижуаны, Vol. 1 _____
 § 2. Raven Press, New York (1976).
17. ME Wall. Анна. NY Acad. Sci., 191, 23 (1971). _____
18. DJ Harvey, BR Martin и WDM Патон. J. Pharm. Phar- MACOL., 29, 495 (1977). _____
19. J. Schou, Л. Д. Прокпор, Г. Дальстрем и С. Роде. Acta Pharmacol. и др Toxicol., 41, 33 (1977). _____
20. SL Кантер, LE Hollister, Ф. Мур и DE Грин. Clin. Chem., 20, 860 (1974). _____
21. ЭР Гаррет и СА Хант. J. Pharm. Sci., 63, 1056 (1974). _____
22. P. Mechoulam. Наука, 168, 1159 (1970). _____
23. P. Будона. Евро. J. Toxicol., 9, 11 (1976). _____
24. М. Фрей-Хауслер и Р. Фрей. J. Chromatogr., 79, 209 (1973). _____
25. М. Фрей-Хауслер и Р. Фрей. J. Chromatogr., 84, 214 (1973). _____
26. AP Меликян и IS Форрест. J. Pharm. Sci., 62, +1025 (1973). _____
27. X. Bowd, Д. Свана, Б. Тоуэлл и JH Тернбулл, в JB Birks, под ред. Возбужденные состояния Biol. Mol. Proc.
 Int. Conf. 1974. М., Чичестер, Англия, стр. 128 (1976). _____
28. JM Schermann, X. Hoellinger, H. X.-Нам-, Р. Бурдона, и E. Fournier. Clin. Химреагент Acta, 79, 401
 (1977). _____
29. WW Просто, Н. Филипович и Г. Вернер. J. Chromatogr., 96, 189 (1974). _____

30. JA Винсон, DD Patel и AH Patel. Анальный. Chem., 49, 163 (1977). _____
31. Л. Lemberger, в Garattini Ф. Хокинг, А. Голдине и IJ Копин, ред., Достижение в области фармакологии и химиотерапии. Академическими Press, Нью-Йорк и Лондон, 10, стр. 221 (1972).
32. JD Тил, EJ Forman, LJ King, EM Piall и В. Маркс. J. Pharm. Pharmacol., 27, 465 (1975). _____
33. JD Грант, SJ Gross, П. Ломакс и Р. Вонг. Природа New Biol., 236, 216 (1972). _____
34. СЕ Кук, ML Хоуз, EW Amerson, CG Питт и Д. Уильямс в RE Willette, ред., Каннабиноидов у людей анализы. Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотических средств Исследовательской монографии 7, DHEW Pub. (ADM) 76-339. Supt. из Docs., США правительственных служб. Распечатать. Выкл., Вашингтон, DC, стр. 15 (май 1976).
35. РТ Tsui, К. Келли, М. Ponpipom, М. Strahilevitz, и AH Sehon. Можно. J. Biochem., 52, 252 (1974). _____
36. AR Chase, PR Kelley, А. Тонтон-Ригби, RT Jones, и Т. Харвуд в RE Willette, изд., Каннабиноидов Assays в мужчинах, влажности от р. 1. См ссылка 34. _____
37. SJ Gross и JR Суарес в RE Willette, ред., Каннабиноидов Assays в людях, с. 10. См ссылки 34. _____
38. PL Williams, AC Моффат и LJ King. J. Chromatogr., 155, 273 (1978). _____
39. GL Rowley, TH Армстронг, CP Кроул, WM Eimstad, WM Hu, JK Кам, Р. Роджерс, Р. Р., К. Е. Рубинштейн, Б. Г. Шелдон, и ЕФ Ульман в RE Willette, изд., Каннабиноидов Assays в людях, с. 28. См ссылки 34. _____
40. DC Фенимор, RR Freeman и PR Лой. Анальный. Chem., 45, 2331 (1973). _____
41. EE Knaus, RT Coutts и CW Казакофф. J. Chromatogr. Sci., 14, 525 (1976). _____
42. Н. К. МакКаллум и ER Кэрнс. J. Anal. Toxicol., 2, 89 (1978). _____
43. ER Garrett и CA Hunt в RE Willette, изд., Каннабиноидов Assays в людях, с. 28. См ссылки 34. _____
44. ER Garrett и CA Hunt. J. Pharm. Sci., 66, 20 (1977). _____
45. FW Karasek, DE Karasek и SH Ким. J. Chromatogr., 105, 345 (1975). _____

46. C. Agurell, Б. Густафссон, Б. Holmstedt, К. Линдер, J.-E. Линдгрэн, И. Нильсон, Ф. Сандберг и М. Asberg. J. Pharm. Pharmacol., 25, 554 (1973). _____
47. А. Олссон, J.-E. Линдгрэн, К. Линдер и С. Agurell в R. E. Willette, ред., Каннабиноиды: Анализ у человека, стр. 48. См ссылки 34. _____
48. М. Нордквист, J.-E. Линдгрэн и S. Agurell в RE Willette, ред., Каннабиноиды: Анализ у человека, стр. 64. См ссылки 34. _____
49. JM Розенфельд, Б. Bowins, Дж Робертс, Дж Перкинс, и А.С. Макферсона. Анальный. Chem., 46, 2232 (1974). _____
50. JM Rosenfeld и VY Тагучи. Анальный. Chem., 48, 726 (1976). _____
51. JM Розенфельд. Анальный. Буквы, _____ 10, 917 (1977). _____
52. DE Зеленый в RE Willette, ред., Каннабиноиды: анализ у людей, _____ п. 70. См ссылки 34. _____
53. ME Wall, TM Харви, JT Bursey, DR раскол и D. Rosen- Тал в RE Willette, ред., Каннабиноиды: анализ у людей, с. _____ 107. См ссылки 34. _____
54. Д. Розенталь, TM Харви, JT Bursey, DR раскола и ME Wall. Biomed. Massa Spectr., 5, 312 (1978). _____
55. JL Валентина, PJ Bryant, PL Gutshall, OHM Gan, ED Томпсон и HC Hiu в RE Willette, изд., Каннабиноидов Assays в людях, с. 96. См ссылку 34. Кроме того, J. Pharm. Sci., 66, 1263 (1977). _____
56. JN Piri В.М. папа, и JJ Шипы. _____ J. Anal. Toxicol. , 3, _____ 129 (1979). _____
57. Л. Лембергер, С. Д. Зильберштейн, Дж Аксельрода и И.Я. Копин. Наука, 170, 1320 (1970). _____
58. JA Винсон, изд., Каннабиноиды: анализ в физиологических жидкостях, ACS Symposium Series 98. Американское химическое общество, Вашингтон, DC (1979). _____
59. RE Willette, изд., Каннабиноиды у людей: анализ. Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотических средств Исследовательской монографии 7, DHEW Pub. (ADM) 76-339. Supt. из Docs., США правительственных служб. Распечатать. Выкл., Вашингтон, DC (май 1976). _____
60. RL Ястребы, под ред. Анализ каннабиноидов в биологических жидкостях. Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотическими Resarch серия монографий. В процессе подготовки. _____
61. RL Фольц и BJ Hidy в RL Ястребов, изд., Анализ каннабиноидов в биологических жидкостях. См ссылка 60. _____

62. CM Bonuccelli. J. Pharm. Sci., 68, 262 (1979). _____
63. DC Фенимор, CM Davis, JH Уитфорд, и SA Харрингтон. Анальный. Chem., 48, 2289 (1976).

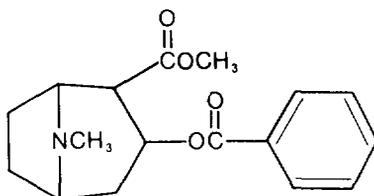
64. AC Моффат в RL Ястребов, изд., Анализ каннабиноидов в биологических жидкостях. См ссылка 60.

65. PL Williams, AC Моффат и LJ King. J. Chromatogr., _____
186, 595 (1979).
66. D. Rosenthal и D. расола. Дж судебной Sci., 24, 282 (1979). _____
67. VJ Hidy и RL Фольц. Заключительный отчет по количественному каннабиноидов в жидкостях организма.
Национальный институт по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами, контракт №
HSM-42-72-183, январь 1980.

Кокаин и его основной метаболит, бензоилэкгонина

Кокаин (3-бензоилокси-8-метил-8-азабицикло [3.2.1] октан-2-карбоновой кислоты метиловый эфир, I), представляет собой алкалоид, полученный из листьев кокаинового *Erythroxylon* или путем синтеза из экгонина. Хотя гидрохлорид кокаина ограничено медицинское применение в качестве местного анестетика, он широко используется в качестве стимулятора наркоманами. Основная географическая источники незаконного кокаина является Перу, Боливия и Эквадор. Растение, из которого она поступает в основном ограничиваются Андами TAIN регионов набора монтажных этих стран.

В этих районах листья растений были жевали коренное население на протяжении многих веков для



I

религиозных целей и в качестве дополнения к работе, так же как кофе потребляется в качестве стимулятора в нашей культуре (1). Однако, когда пси- choactive ингредиенты листа выделяют и вводят или не- предавать интраназально в концентрированной форме, фармакологические эффекты могут быть совершенно отличными от тех, которые имеют место в традиционной схеме использования кокаина среди индейцев Анд. Листы содержат лишь около 1 процента кокаина, и пероральный путь, как представляется, задержать поглощение и снижения токсичности.

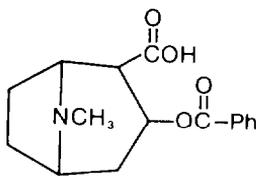
Кокаин был впервые выделен из листьев коки в 1860 году, и его thera- peutic возможности быстро признана некоторыми врачами, особенно в Европе. К 1890 году она была включена в различных патентных панацеи и «тоников», такие как Кока-Кола, хотя с 1910 последний не содержал каких-либо кокаин (2). Опасные свойства кокаина вскоре стало очевидным, и после его включе- ния в законе США наркотиков в 1914 году, кокаин пошел «под землей», которые будут использоваться в первую очередь в богемной субкультуры художников и musi- тиков. Она возродилась около 1970 как препарат «статус» среди наркоманов со средним классом в этой стране, которые обычно относятся к нему как «кокса» или «снег» (3). Причина его популярности является характер стимуляции она производит; то есть, чувство повышенной quality, секс-психической энергии,

Кокаин является одним из самых мощных природных центральных нервных СИСТЕМЫ, стимуляторы известных (4). Он блокирует обратный захват норадреналина в нервных окончаниях, действуя в первую очередь на кору головного мозга для повышения двигательной активности. Передозировка вызывает тревогу, депрессию и неясность, и в конечном итоге может привести к судорогам и дыхательной ар-отдыха. Прямая кардиотоксичность может привести к остановке сердца, и даже небольшие дозы повышают частоту пульса и артериальное давление. Фибрилляция желудочков и внезапная смерть могут привести, который устанавливает кокаин отдельно от других местных анестетиков, таких как лидокаин и новокаин, которые имеют тенденцию к десенсibilизации миокарда к фатальной аритмии. Фатальная пероральная доза кокаина, как указана, 1,2 г, но так же мало, как 20 мг наносить на слизистые оболочки могут привести к смерти, и анафилактический шок со смертельным исходом сообщается с использованием еще более низкими дозами (3). Недавнее исследование доза-реакция кокаина на добровольцах показали, что 100 мг вводят интраназально или 10 мг внутривенно было достаточно, чтобы вызвать значительные субъективные и сердечно-сосудистые эффекты (5). Продолжение носовой ингаляции, обычно называемый «snort- ИНГ», может привести к некрозу слизистой оболочки носа.

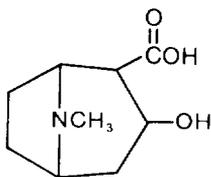
Хотя истинная физическая зависимость и толерантность не доказаны для кокаина, очень сильная психологическая зависимость может развиваться. Привычка кокаина считается самым соблазнительным, быстро inji- OE, и трудно искоренить все привычки наркотиков (4). Частое использование больших доз может привести к потере веса, бессонницы, тревоги и (2) с длительным использованием высоких доз, истинный токсичны психоз может привести как и амфетамин, вызывая симптомы паранойю и агрессивное поведение (3).

Фармакокинетика и метаболизм

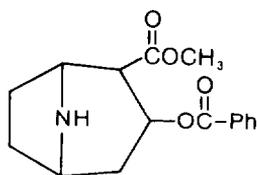
Кокаин быстро метаболизируется, главным образом, де-этерификации [гидролиза плазмы эстераз (6) и ферментов печени (7)] и N-деметилирования. Эти процессы приводят к образованию бензоил- эгониной (II), эгониин (III), эгониин метилового эфира, а также нескольких N-деметилируют продуктов. Из этих метаболитов, только норкокаин (IV) показали биологическую активность, эквивалентный кокаин в inhibi- ции з Н-норэпинефр поглощение синапсом головного мозга крыс (8). Радиоизотопное исследование с двумя добровольцами показало, что N-деметилирования имеет место у человека после перорального введения кокаина (9).



II



III



IV

Бензоилэргонина и эргонин весьма полярны и поэтому они не пересекают гематоэнцефалический барьер в фармакологически значимых концентрациях. Тем не менее, норкокаин был обнаружен в мозге обезьян данных повторных доз кокаина (8), и N-деметилирование кокаина было показано, что происходит в головном мозге крыс (10). Липофильный характер кокаина и норкокаина помогает объяснить их проникновение через гематоэнцефалический барьер. В опытах на животных, которые сравнивали расположение и фармакокинетику радиоактивно кокаина в острой по сравнению с хронически обработанных крыс, хроническое лечение привело к последовательно более высоким концентрациям кокаина будучи поглощенным в жировых депо. Хотя кокаин быстро появился из мозга при остром лечении,

У собак,

Однако, мозг-к-плазме отношение кокаина было хронически ниже, чем в остро обработанных животных от 2 до 4 ч после инъекции, и не- метаболизируется кокаин не сохраняется в ЦНС (12). Радиоактивное исследование на крысах показало также локализацию кокаина или его метаболитов в других тканях, в том числе почек, легких, селезенки, семенников, кишечника, мышц, печени и сердца (13).

У человека меньше, чем 20 процентов, и часто только один процент, из материнского препарата выводится с мочой; количество выводится из организма связана с дозой и мочи кислотность. Кокаин также в желчи. В моче главных областей метаболитов, II (25-54 процентов от дозы) и III, являются хорошо растворимыми в воде и в значительной степени из организма в течение 24-36 ч после введения кокаина (14). Время-Конечное исследование экскреции бензоилэргонина после интраназального введения кокаина в человеческих субъектов показало, внешний вид метаболизируемые в облегченном 1-4 ч и пиковой концентрации мочи на 10-12 ч (15). В другом исследовании, пик концентрации мочи бензоилэргонина (до 75 мкг / мл) произошла 1-12 ч после назальной ингаляции клинических доз кокаина (1,5 мкг / кг) и уменьшается медленно, в течение нескольких дней, она по-прежнему обнаруживается с помощью радиоиммуноанализа на 144 ч у одного пациента. Максимальные концентрации в моче неизменного кокаина (до 24 мкг / мл) имели место в течение 2 ч с интраназального введения и быстро снижается. Коэффициенты бензоилэргонина / кокаин в моче были слишком разнообразны, среди людей, чтобы быть полезным в прогнозировании концентрации кокаина из данных бензоилэргонина или наоборот (16). После внутривенного введения дозы 100 мг гидрохлорида кокаина до трех человеческих субъектов, концентрации кокаина в плазме достиг максимума через 5 мин, а затем снижалась в течение 5-6 ч, с распределительном периодом полураспада в плазме 20-40 мин, что соответствует время курс психологических эффектов. Средний биологический период полураспада кокаина в плазме, как сообщалось, 2,8 ч. Максимальные концентрации в моче неизменного кокаина (до 24 мкг / мл) имели место в течение 2 ч с интраназального введения и быстро снижается. Коэффициенты бензоилэргонина / кокаин в моче были слишком разнообразны, среди людей, чтобы быть полезным в прогнозировании концентрации кокаина из данных бензоилэргонина или наоборот (16). После внутривенного введения дозы 100 мг гидрохлорида кокаина до трех человеческих субъектов, концентрации кокаина в плазме достиг максимума через 5 мин, а затем снижалась в течение 5-6 ч, с распределительном периодом полураспада в плазме 20-40 мин, что соответствует время курс психологических эффектов. Средний биологический период полураспада кокаина в плазме, как сообщалось, 2,8 ч. Максимальные концентрации в моче неизменного кокаина (до 24 мкг / мл) имели место в течение 2 ч с интраназального введения и быстро снижается. Коэффициенты бензоилэргонина / кокаин в моче были слишком разнообразны, среди людей, чтобы быть полезным в прогнозировании концентрации кокаина из данных бензоилэргонина или наоборот (16). После внутривенного введения кокаина. Концентрации в плазме метаболита быстро увеличивается в течение первого часа, оставались стабильными в течение 2-4 ч, а затем медленно снизились. Через 24 часа, то бензоилэргонин все еще обнаруживается. Сохранение бензоилэргонина в плазме предположил, что он был сильно связан с белками плазмы (17). Фармакокинетические Измерения при были сравнимы с таковыми у пациентов, получавших кокаин в виде местного анестетика, и указали, быстрыми

Поглощение кокаина через слизистые оболочки. Плазменные концентрации кокаина в другом исследовании человеческого быстро увеличивались в течение 15-20 мин после интраназального применения 1,5 мг / кг, достигли максимум в 15-60 мин, а затем постепенно уменьшаются в течение 3-5 ч. Максимальные концентрации в плазме в диапазоне от 120 нг / мл до 474 нг / мл (18,19). В случае острой интоксикации, концентрации в крови кокаина как низко как 200 нг / мл были связаны с со смертельным исходом, хотя концентрации до 9,0 мкг / мл чаще сообщалось в смерти кокаина, когда никакие другие препараты не присутствовали (20).

АНАЛИТИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА

Из-за его быстрого метаболизма, обнаружения и количественного со- Caine в жидкостях организма трудно. В дополнении к низким концентрациям, которые могут встречаться в крови и в моче (21), анализ кокаина представляет технические проблемы, вызванные в результате гидролиза препарата с помощью плазменных ферментов и в условиях хранения и лабораторные манипуляции. Даже при хранении в замороженном состоянии, был показан 40 процентов от кокаина в плазме, чтобы быть потеряны в течение 5 дней, и 60 процентов в течение одного месяца; при комнатной температуре 45 пер- процентов кокаина в плазме были потеряны в течение 1 ч. Тем не менее, добавление фторида натрия (2,5 мг / мл плазмы) в плазме ингибировать ферментативный гидролиз предотвратить потерю какого-либо заметного кокаина в плазме, поддерживаемой при комнатной температуре в течение 2 ч (22). Под сильно щелочной (pH > 10) или кислотные (<5 pH) условия, хими- кал гидролиз кокаина бензоилэксгонина и экгонина является уско- создававшие. По этим причинам, измерение метаболитов кокаина, в частности бензоилэксгонина были подчеркнута в развитии конфликтных процедур анализа. Тем не менее, метаболиты кокаина очень полярные, а также амфотерные; они не являются легко экстрагируемыми в органические растворители, обычно используемых для скрининга лекарственных средств, и, следовательно, специализированные методы должны быть использованы для их извлечений из биологических материалов,

Колориметрические методы, которые в лучшем случае полуколичественные, которые были использованы для определения кокаина в моче (23) и других биологических жидкостях. Раннее исследование распределения и метаболизма со- Caine у собак и кроликов на основе такого метода; она участвует экстракцию хлороформа, прохождение экстракта через колонку Су- Crose, и добавление бромкрезолового фиолетового. Оптические densi- связи получаемых желтых растворов определяли на спек trophotometer при 410 нм и чувствительностью 0,5-1,0 мкг / мл в моче, крови и тканевых гомогенатах было сообщено (24,25). Спектретре trophotometric метода, однако, не является ни специфичной ни suffi- ently чувствительна для использования в большинстве случаев анализа кокаина.

Тонкослойная хроматография (ТСХ), обычно используется для рутинного иденти- фикации злоупотребляли препаратов в моче, требует специальных систем растворителей для разделения, а также для извлечения метаболитов кокаина. В одном методе ТСХ, кокаин и его метаболиты экстрагируют из мочи с 25 процентов этанола в хлороформе при pH 10-11 и подвергали хроматографии на пластинах с силикагелем, разработанных в смеси метанол: аммиак (99: 1) и опрыскивают с iodoplatinate реагентом. Растворитель СИСТЕМА, отделяет от экгонина бензоилэксгонина и кокаина, но

отделить два последние соединения друг от друга, что было необходимо использовать этилацетат: метанол: аммиак (85:10:10) (26). Апо- Theг ТСХ анализа участвует экстракции смесью хлороформ: изопропанол: дихлорэтан (8: 1: 3) при pH 8,5. Чувствительность бензоилэгонина анализируют с помощью этой процедуры составляла 3-5 мкг / мл (27). Совсем недавно, метод тонкослойной хроматографии с использованием двойной системы растворителей на силикаты Ца гель листов включал стадию бутилирования после экстракции совместного Сaine и его метаболитов из мочи смесью хлороформ: этанол (3: 2) при pH 8-9; при условии, что чувствительность 3 мкг / мл (28). Пределы чувствительности для ТОГО кокаина и бензоилэгонинной в моче были впоследствии снижены до 0,1 и 0,25 мкг / мл, соответственно, путем распыления разработанных пластин с реагентом Dragendorff по которым следует **распыление разбавленных Н₂ ТАК₄ и воздействие паров йода (29). Другое усовершенствование процедур** обнаружения ТСХ участвует предварительное поглощение соединений на бумагу, загруженную с СА-2 катионообменной смолой. Извлечение из смолы была сделана смесью хлороформ: изопропанол: дихлорэтан (4,5: 0,9: 4,5); чувствительность для кокаина и его метаболитов составляет 1 мкг / мл. в 20 мл мочи. Если другие препараты должны были быть проанализированы в той же моче образца и вносящий, кокаин и другие лекарства были впервые извлечены из раствора при pH 10 и хроматографируют в системе растворителей двухступенчатой. Бензоилэгонина экстрагировали из водной фазы после подкисления буфера и переналадки pH до 8.1-8.4. Чувствительность для бензоилэгонина составлял 2 мкг / мл. В качестве альтернативы, бензоилэгонин в одиночку непосредственно экстрагируют из 5 мл мочи с хлороформом: изопропанол:

Фермент-метод иммуноанализа умножается (EMIT) широко используется в скрининге мочи на злоупотребление кокаином, и имеет предел обнаружения 1 мкг / мл бензоилэгонина. Нет экстракции не требуется, а анализ занимает менее 2 минут, чтобы выполнить.

Он не обнаруживает кокаин

и он не применим к плазме (31). Имеющийся в продаже радио- иммуноанализа был разработан на основе ¹²⁵I-меченный benzoylescgo- девять производных (32). РИА в настоящее время широко используется для скрининга образцов мочи для бензоилэгонина, а также может быть использован для количественной измерения «бензоилэгонина эквиваленты», которые включают в себя кокаин и другие тропановых алкалоиды, которые вступают в перекрестную реакцию с антителом. Анализ обнаружит бензоилэгонин в моче концентрациях, как низко как 2 нг / мл, но 100 нг / мл были рекомендованы в качестве концентрации «среза» для позитивов в рутинном скрининге. Оценка методы РИА была опубликовано, в котором она сравнивалась с ГМ, TCM и испускают методы анализа бензоилэгонина в моче (33).

Количественный анализ кокаина в биологических жидкостях опирался прежде всего на разработку методов газовой хроматографии (ГХ). Кокаин может быть газ хроматографирует без дериватизации, но его метаболиты не может. Группы карбоновой кислоты II и III должны быть этерифицированы с некоторым реагентом, таким как диазометан, dimethylfor- mamide диметилацеталь N, N-дициклогексил карбодимид, или n-бутанол трифторид бора. Этерификация с 2-хлорэтанола в пре-

чувство трихлорида бора имеет преимущество введения галоген-генерированного заместителя, который оказывает молекулу, пригодную для обнаружения электронофильного захвата (34). Процедура экстракции растворителя может быть использована для разделения бензоилэргонина и эргонина из основных и нейтральных компонентов биологических экстрактов перед этерификацией и ГЖМ анализом метаболитов (35).

Газовая хроматография (ГХ) с детектированием пламенно-ионизационным (FID) часто используется для обнаружения кокаина и метаболитов, эсперс-союзника в моче.

В одном из первых исследований человеческого кокаина метаболитом в моче, ГХ-ПВД с бензгексол в качестве внутреннего стандарта был использован для измерения кокаина в моче. Хроматография была на 3-й колонке OV-17 при 185 °С, а линейный отклик был получен в диапазоне 0,5-15,0 мкг / мл. Бензоилэргонина анализировали в этой системе путем непрерывной экстракции хлороформом, содержащим 5-

α-холестан в качестве внутреннего стандарта; извлеченный бензоилэргонин метилировали к кокаину для газовой хроматографии (36,37). GC-ПВД на 2,5-й колонке SE- при 200 °С было сообщено в качестве способа, способного обнаруживать 1 мкг / мл бензоилэргонина в моче. Бензоилэргонин высаливали из мочи в 95-процентном этаноле, очищают с помощью тонкослойной хроматографии, элюировали в воде, а также метилированное перед тем газом chromatography. Общий выход составил лишь 30-40 процентов, но эффективность 90-100 процентов была сообщена для первоначального этанола экстракта (38). Кокаин может быть ошибочно принимают за пентазоцин, levorphanol или метаквалон на OV-17 колонн, обычно используемых для скрининга лекарственных средств; по этой причине, реакция на колонке кокаина с триметил гидроксидом анилиной, что дает неопознанный проток с различным временем удерживания, было предложено в качестве confirmatory шага обнаружения кокаина в моче (39). Для одновременного определения 9 CNS-активных лекарственных средств в плазме крови человека, включая кокаин, анализ ГХ-FID на 3-й колонке OV-1 колонке с последующей экстракцией бензол-изопропанол при pH 10. Восстановление кокаина составляла около 90 процентов, и пределы чувствительности соответствуют чтобы концентрации лекарственного средства в плазме крови 0,05 мкг / мл. Метод имел преимущество сравнительной простоты для обычных целей (40). Другой был предназначен для определения, как кокаин и бензоилэргонина в моче участвует метилирования метаболита, превращая его в кокаин в 72-процентном урожае перед анализом ГХ-FID на 3-й колонке OV-17 колонке. Butylanthraquinone был использован в качестве внутреннего стандарта. Способ экстракции (хлороформ: этанол, 4:

5.5-9.5. Чувствительность сообщила была 0,20 мкг / мл у мужчин в 5 мл, что ему определенные были адекватным для измерения концентрации лекарственного средства в моче и метаболита послеоперационных пациентов до 24 ч после местного кокаина анестезии (250 мг, применяемых к слизистой оболочке носа) (41).

Аналогичным образом, одновременное определение кокаина и его метаболитов в моче, с помощью газовой хроматографии на колонках с покрытием с 3-процентами SP-2250-DA или 3-процента SE-30, было сообщено. В этом случае экстракция была в хлороформ: этанол (3: 1), а затем пропыляция из бензоилэргонина с использованием органического основания и 1-иодпропана. Recovery 99 процентов от кокаина и 80 процентов от бензоилэргонин, в сочетании с 98-процентной конверсией метаболита в его

n-пропиловый эфир, при условии, пределы обнаружения 0,2 мкг / мл в 5 мл мочи. требовалось Назад экстракции и очистки, а также синтез n-пентил эфира бензоилэконгина для использования в качестве внутреннего стандарта. В процедуре измерена концентрации в диапазоне от 0,2 до 18 мкг / мл бензоилэконгина в пробах мочи из программ скрининга лекарственных средств, а также продемонстрировали концентрации менее 0,3 мкг / мл кокаина и 8-136 мкг / мл бензоилэконгина в объединенной 8-часовой моче образцы из послеоперационных пациентов после анестезии кокаина (42).

Способ сообщался для одновременного анализа кокаина и бензоилэконгиной в крови, желчи, моче или ткани участвует экстрактивную стадию алкилирования для преобразования бензоилэконгина его этилового эфира, который затем легко отделяется от кокаина с помощью газовой хроматографии (3 пер- центра OV-17 , 225 ° C). n-пропиловый бензоилэконгин был использован в качестве стандарта меж- конечного (43).

Чувствительность ГХ-анализа для кокаина может быть увеличена до 100 раз с использованием детектора азотно-фосфорного. С этим типом детектора суб-нанogramм количеств лекарственного средства может быть измерено Ас- сь с отчетным процедурой, которая включала использование пропилового эфира **бензоилэконгина в качестве внутреннего стандарта, рекстракции в 0,1 Н₂ ТАК₄ и хроматографии на колонке с OV-17 при 255 ° C (21)**. Другое применение GC с обнаружением азотно-фосфорным для измерения кокаина в крови участвует в Этилморфина вну- треннего стандарта, экстракцию бензола: изопропанол (9: 1), и хроматография на 3 процента колонка SP-2100-DB. После местного применения кокаина в слизистой оболочке носа, так же мало, как 20 нг кокаина был обнаружен в 1 мл цельной крови с помощью этого метода (44).

Детектор электронного захвата был также использован для измерения бензоилэконгина в крови. Процедура включала извлечение метаболита и внутреннего стандарта (chlorproethazine) из плазмы с хлороформом: этанол (4: 1) при pH 9,5. Высушенный экстракт alky- веден с пентафторбензилхлорида бромид и производного секционированной в бензол, чтобы исключить более пол рные вещества, мешающие затем повторно экстрагируют в кислоту. Чувствительность метода составила 5 нг zoyleconpine на Бен- мл плазмы. Тем не менее, наличие фонового загрязняющего пика в моче снизилась чувствительность процедуры до 50 нг / мл для анализа мочи (17).

Измерение 20-30 нг / мл кокаина в моче, без необ- Sity испарительных процедур концентрации, было достигнуто в адаптации методики ОГО-ECD, который использовал 0-ацилированный производный тензор восстановленного кокаина (гептафтормасляный ангидрид или pentafluoro- пропионовый ангидрид добавляю **к экстракту циклогексана следующие его снижение Тион с LiAlH₄**) (45). **Весьма аналогичная процедура была** впоследствии использована для измерения кокаина в плазме, а также моча (46).

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) на колонке с обращенной фазой использовали для разделения и измерения кокаина и Бен zoyleconpine, извлеченной из мочи. Предел обнаружения 0,1 мкг / мл мочи была достигнута путем мониторинга ультрафиолетового поглощения ВЭЖХ эфлюента при 200 нм. Процедура хроматографии также ослабленным

дозволенное разделение и обнаружение норкокаина и benzoylecgo- девять; Однако, debenzoyleated метаболиты, такие как экгонина не мог быть обнаружен из-за недостаточного поглощения УФ, даже при 200 нм (47).

Высокую специфичность и чувствительность газовой хроматографии / масс-спектрометрии (ГХ / МС) был применен к анализу кокаина и его метаболитов в биологических жидкостях (48-50). Концентрации кокаина и норкокаина в моче человека определяли с помощью просе- Dure, которые участвуют первоначальной экстракции при pH 8,5 в циклогексан с последующим реэкстракции в 0,1 N HCl, и после корректировки основного pH с помощью 1 N NH₄ OH, реэкстракции с циклогексаном. Перед анализом ГХ / МС норкокаина превращали в его N-trifluoroacetate производного amide. Дейтериевые меченые аналоги были использованы в качестве внутри- нальных стандартов. Кокаин-2 ЧАС₃ был получен путем обработки бензоил- экгонин с диметилформамид диметил-2 ЧАС₆ ацеталь (Пирс, Rock- брод, Иглинойс), и pogsocaine-2 ЧАС₃ был получен N-demethyla- ции дейтерированного кокаина, Анализ измеряется 2 нг / мл кокаина и норкокаина с точностью до 5 процентов (48). Аналогичный анализ был разработан той же исследовательской группой для количественного определения кокаина и бензоилэксгонина. Меченного дейтерий внутренних стандарты были вновь использованы, кроме дейтерированная кокаин была подготовлена alkyl- ушного норкокаина с C₂ ЧАС₃ 1 и benzoylecgonine-2 ЧАС₃ был создан из меченого кокаина. Хлороформ: изопропанол (4: 1) был использован для извлечения бензоилэксгонина из мочи после корректировки pH до 9 с помощью 0,1 N NH₄ Ой. Экстрагируют бензоилэксгонин затем преобразуется в его этиловый эфир, путем обработки диазоэтана, порожденного добавлением N-этил-N-нитро-N-нитрозогуанидина к двухфазным раствором KOH и эфиром. ударная ионизация электронов дали молекулярные ионы умеренного изобилия для кокаина (m / z 303) и этилового эфира бензоил- экгонина (m / z 317), которые были вместе с контролируемым молекулярными ионами для дейтерированных внутренних стандартов. Когда все системы работают хорошо, чувствительность анализа примерно 2 нг / мл кокаина и 5 нг / мл бензоилэксгонина может быть достигнута (49)

В другом применении ГХ / МС в анализе метаболитов кокаина в моче, бензоилэксгонин одновременно экстрагируют из мочи, и его превращают в этиловый эфир с помощью 10-минутной процедуры экстрактивной-алкилирования. Бутиловый эфир бензоилэксгонина служил в качестве внутреннего стандарта. Количественное было достигнуто с помощью ГХ / МС с использованием probability- на основе сопоставления (SO).

ВЭЖХ является перспективным в качестве средства очистки полярных метаболитов, извлеченные из жидкостей организма; Преимущества экстракции селективность и adaptabil- ность к автоматизации (51). Другие сообщения Процедура экстракции изменяется с аналитическим методом и с целью анализа. Кокаин легко извлекается из щелочных водных сред в органических растворителях, в том числе cyclohexane (12,45), простой эфир (36,37), 2 процента изоамилового спирта в n-гептан (17,18,21), бензол: изопропанол, 9: 1 (восстановление 85-90 процентов) (40,44) и хлороформ (восстановление 85-100 процентов) (24). Восстановление кокаина лучше всего при pH 9,5 (93 процента из смеси хлороформ: этанол). Это падает до 76 процентов при pH 10,5 из-за гидролиза (52).

Бензоилэконина может быть удален из водной фазы путем исчерпывающего непрерывной экстракции хлороформом; по одной экстракции смесью хлороформ: изопропанол: 1,2-дихлорэтан (4,5: 0,9: 4,5) (30) или

chloroformnethanol (4: 1, восстановление 65-80 процентов) (17,41,42); соленая вместе с другими полярными

метаболитов в спирт из К₂ Колорадо

раствор или КН₂ ПО₄ К₂ НРО₄ Раствор (38); или экстрагируют из мет- Apol лиофилизированного мочи (90-100 восстановления процента) (38). Ниже рН возможно с высаливанием процедур позволяет избежать омыления бензоилэконина. Адсорбция на неионные (например, XAD-2) смолы, с последующим элюированием смесью хлороформ: изопропанол (3: 1), рекомендованный реко- для извлечения некоторых метаболитов кокаина из ткани homo- genates, но экгонин и погесопіне не адсорбируются смола (35).

Два недавно изданных книг ознакомиться с информацией об истории, химии, фармакологии, анализа и социологические аспекты совместного Caine (1,53).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОЦЕДУРА

Потому что кокаин быстро метаболизируется часто желательного анализа чуждой как для исходного лекарственного средства и его основной метаболит, benzoylecgo- девять. Таким образом, две процедуры описаны; оба модификации опубликованных методов, разработанных в Центре по населенным Toxicology, Университет штата Юта (54). Процедура 1 состоит из простого, прямого отжима, которая позволяет быстрое измерение только кокаин концентраций. Процедура 2 занимает больше времени, но позволяет одновременное измерение обоих кокаина и бензоилэконина концентрациях. Последняя процедура состоит из экстракции хлороформа: isorgo- rapol из хлоридно-насыщенного раствора натрия в жидкости организма, дериватизаций извлеченного бензоилэконина нагревания с N, N-ди-dimethylformide-н-пропил ацеталь,

Кокаин быстро гидролизуется в плазме эстеразы с экгоинными метилового эфира (55), поэтому очень важно, чтобы ингибировать эти ферменты, как только собирали образцы крови для последующего анализа кокаина (56). Это может быть сделано путем сбора образца в пробирке, содержащей фторид Радиового SO₂, такие как серые закупоривает 7 мл Venoject пробирка (Kim- BLE-Terumo, Inc, Elkton, MD 21921), которые поставляются с 17,5 мг твердого вещества фторид натрия и 14 мг оксалата калия. Дополнительных 50 мкл насыщенного раствора фторида натрия добавляет для каждого мл крови. Образец затем центрифугировали и плазму переносили в тefлоном, винтовой колпачок трубки и культуры в замороженном виде до анализа.

Стандарты и реагенты

Кокаин гидрохлорид и бензоилэконин высокой чистоты может быть Пур чеканка из прикладной науки лабораторий, State College, PA 16801. кокаина гидрохлорид, меченных 3 атомов дейтерия на N-метильной группы (кокаиновой₂ ЧАС₃ НСl) и бензоилэконин меченный дейтерием

на бензоильную группу (benzoylecgonine-2 ЧАС₃) были получены из Национального института по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами. На основании масс-спектрального анализа кокаиновой 2 ЧАС₃ имел изотопный состав: 2 ЧАС₃, 96 процентов; 2 ЧАС₂, 1 процент; 2 ЧАС₁, 1 процент; а также 2 ЧАС₀, 0 процентов. Изотопный состав benzoylecgonine-2 ЧАС₃ был: 2 ЧАС₅, 7 процентов;

2 ЧАС₄, 31 процентов; 2 ЧАС₃, 40 процентов; 2 ЧАС₂, 21 процентов; 2 ЧАС₁ а также 1 ЧАС₁, 0 процентов.

Подготовка буфера pH 9,6 путем растворения 500 г калия моно- гидрофосфат (K₂ HPO₄) примерно в 500 мл дистиллированной воды. Дайте раствору остыть до комнатной температуры, а затем добавить удовлетворительной дистиллированную воду, чтобы сделать ровно один литр.

N, N-диметилформамид-ди-н-пропил ацеталь был приобретен у фирмы Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI 53233.

Маточные растворы кокаина и бензоилэкгонина получает, как следует щим образ с целью определения калибровочных графиков и подготовки рабочих стандартов. Взвешивание в 100-мл мерную колбу около 11,2 мг гидрохлорида кокаина (эквивалентно 10 мг свободного основания) и 10 мг бензоилэкгонина, и записать весов с точностью до 0,1 мг. Растворите измеренное лекарственное средство и метаболит примерно 75 мл метанола, а затем добавить дополнительный метанол, получая ровно 100 мл раствора. Это решение будет именоваться как «0,10 мг / мл исходного раствор», хотя оно должно быть мечеными с его фактическим сгущением, основанным на точный измеренные веса кокаина и зоулеcgонине Бен. Серия рабочих стандартных растворов затем могут быть получены путем соответствующего разбавления исходного раствора, как описано в главе 2.

Исходный раствор кокаиновой 2 ЧАС₃ и benzoylecgonine-2 ЧАС₃ заранее приготовленном таким же образом.

Для измерения лекарственного средства и метаболизируемых облегченного в жидкостях организма в диапазоне концентраций от 1 до 1000 нг / мл, добавление приблизительно 40 нг внутренних стандартов каждых мл жидкости тела является удовлетворительным. Это может быть удобно сделать путем добавления 100 мкл метанольного раствора, содержащего 400 нг / мл и кокаиновой 2 ЧАС₃ и benzoylecgonine-2 ЧАС₃ чтобы каждый мл жидкости тела. PRE- срезать с / мл раствора внутреннего стандарта 400 нг путем разбавления 1 мл 0,10 мг / мл исходного раствора кокаиновой 2 ЧАС₃ и benzoylecgonine-

2 ЧАС₃ до 250 мл метанола.

Хранить запас и рабочие стандартные растворы в хорошо закупоренных или сар- PED стеклянных сосудов в темноте при температуре ниже 0 ° C.

Экстракция - Метод 1 (Кокаин только)

Передача 1 мл цельной крови, плазме или моче к 5-мл стеклянных-Stop- pered, коническую центрифужную пробирку. Добавьте 100 мкл внутреннего стандартного раствора, содержащего кокаиновой 2 ЧАС₃ и benzoylecgonine-2 ЧАС₃ в концентрациях, от 400 нг / мл. Vortex смеси в течение 10 сек, а затем позволить ему уравниваться в течение 15 мин. Добавить 1 мл K₂ HPO₄ буфер (pH 9,6) с последующим добавлением 100 мкл растворителя, состоящего из смеси толуол: гептан: изо- амилового спирта в объемном соотношении 70:20:10. Немедленно закрывают пробирку и вихрь в течение по меньшей мере 30 сек. Центрифуга смеси при 2000 x G в течение 15 мин. Органический растворитель должен образовывать узкую верхний

слой, из которого аликвоту может быть удалена с помощью шприца для входов injection в ГХ / МС.

Если отдельный слой растворителя не Обь сохраняется, добавить дополнительные 100 мкл органического растворителя и recentri- Fuge.

Экстракция - Метод 2 (Кокаин и бензоилэкогонина)

Передача 1 мл цельной крови, плазмы или мочи на 20-мл пробирку, снабженную тефлоновой футеровкой винтовой крышкой (от 0,5 до 2 мл образца и вносящий может быть использован, но оно должно быть точно измерено.) Добавьте 100 мкл **внутреннего стандартного раствора, содержащего кокаиновой 2 ЧАС3 и Бен зоулеосонине-2 ЧАС3 при концентрации 400 нг / мл.** Vortex в смешанной форме в течение 10 сек и позволяет ему уравниваться в течение 15 мин. Проверять pH. Если это не $7,0 \pm 0,5$, добавляют 1 мл буфера, pH 7. Пропитайте смесь с хлоридом натрия (около 0,5 г), чтобы улучшить эффективность экс- вытяжения бензоилэкогонина. Добавить 8 мл растворителя mix- ры хлороформа: изопропанол (9: 1 об / об). Закрывают трубку и проверьте утечки вокруг крышки. Аккуратно перемешать содержимое в течение 30 мин с использованием моторизованной чачалки или ротатора. Центрифуга в течение 5 мин, удалить верхний водный слой путем аспирации, и передать нижний органический слой в 12-мл коническую, притертой пробкой пробирку центрифуги. Если твердые частицы присутствуют в органическом экстракте, она должна быть удалена путем фильтрации органического экстракта через силилированные стекловаты. Важно, что органический экстракт переносили быть АВ- solutely сухой и лишена какой-либо из интерфейса липида, который образует между фазами. Растворитель удаляют выпариванием с генера- ОДВТ потоком азота или отфильтрованного воздуха и тепла при температуре не выше 70°C . Все летучие растворители должны быть удалены! Добавьте 50 мкл диметилформамида и 50 мкл N, N-диметилформамид-ди-н-пропил-ацеталь. Нагревание с обратным холодильником смеси в течение 30 сек над открытым пламенем (см Рассмотрения процедуры экспериментальной). Дайте смеси остыть до комнатной температуры и затем добавляют 1 мл 0,5 NH N-диметилформамид-ди-н-пропил ацеталь. Нагревание с обратным холодильником смеси в течение 30 сек над открытым пламенем (см Рассмотрения процедуры экспериментальной). Дайте смеси остыть до комнатной температуры и затем добавляют 1 мл 0,5 NH N-диметилформамид-ди-н-пропил ацеталь. Нагревание с обратным холодильником смеси в течение 30 сек над открытым пламенем (см Рассмотрения процедуры экспериментальной). Дайте смеси остыть до комнатной температуры и затем **добавляют 1 мл 0,5 NH2 TAK4. Vortex смесь в течение примерно 10 сек. Добавьте 3 мл системы растворителей, состоящей из tolu- ена: гептан: изоамиловый спирт**

в объемном соотношении 70:20:10. вихревой в течение 30 секунд, а затем центрифуги. Удалить верхнюю органическую фазу с помощью аспирации. Нейтрализовать фазу водного раствора кислоты путем добавления 1 мл **0,5 N NaOH и 1 мл K2 HPO4 буфер. Вихревой смесь и проверить, что значение pH находится в пределах от 9 до 10.** Если это не так, отрегулируйте, добавив несколько **капель 0,5 N NaOH или 0,5 NH2 TAK4, в зависимости от обстоятельств. Немедленно извлечь кокаин и бензоилэкогонин н-пропиловый эфир из основного водного раствора добавлением 3 мл толуола: гептан: изо- амилловый спирт (70:20:10) растворителя, вихревые в течение 30 сек, и центрифуги. Передача с помощью одноразовой пипетки Пастера верхний органический слой с силилированным, 12 мл концентратора трубки, имеющей коническую или ниппель-образную форму дна. Удалить растворитель выпаривания при слабом потоке азота или отфильтрованного воздуха и при температуре не выше 70°C . Развести остаток экстракта в 30 мкл хлороформа для анализа ГХ / МС.**

ГХ / МС анализ

Экспериментальные условия для ГХ / МС анализа кокаина и н-пропилового эфира бензоилэкогонина являются следующие:

ГХ колонок:	1,8 м x 2 мм колонка (ID) Стекло упаковано с 3 процентами OV-1 на газ Chrom Q 100/120 меш (Applied Science Laboratory, «State College, PA 16801)
Газ-носитель:	Метан, 15-20 мл / мин
Реагент газ:	Аммиак, вводится в ионную камеру, как описано в главе 2
Температуры	Инжектор, 280 ° C Колонка, 230 ° C ГХ / МС линии передачи, 280 ° C Источник ионов, 160 ° C

В этих условиях кокаин должен элюировать из газового chromatograph при температуре от 2 до 4 мин, и н-пропиловый эфир бензоилэксгонина должен элюирование при температуре от 3 до 5 мин.

Перед началом ГХ / МС анализ образцов, производительность общей системы ГХ / МС должны быть оценены и оптимизированы обозначении сcribed в главе 2. Ионы, которые будут отслеживаемые являются **протонированные ионы молекулы кокаина (m / z 304)**, **кокаиновый 2 ЧАС₃ (m / z 307)**, **Бен zoylecgonine н-пропиловый эфир (m / z 332)**, и **benzoylecgonine-2 ЧАС₃ н-пропиловый эфир (m / z 335)**. **С отбракованных клапана в отбракованных поло- ции, впрыснуть в ГХ / МС 2 до 6 мкл органического экстракта из любой процедуры 1 или 2. Примерно через 1 мин переключить отбракованных клапан так, чтобы поток весь газ-носитель поступает источник ионов масс-спектрометр и начинает сбор данных.**

Если экстракт от 1 процедуры анализируются, только ион кокаина масса (m / z 304 и 307) контролируется. Для анализа экстрактов из процедуры 2 лучшей чувствительности достигается за счет первого мониторинга только ионов кокаина массы до тех пор, кокаин не элюированной; то benzoylecgonine н-пропиловый эфир ионные массы контролируются. Если система данных ГХ / МС не допускает быстрые изменения контролируемых ионных масс, все четыре иона массы должны быть проверены во время элюции препарата и дериватизированного метаболита. Как правило, последняя процедура приведет лишь небольшую жертву чувствительности. Когда н-пропиловый эфир бензоил- экгонина имеет элюировало, прекратить сбор данных и повторно включить отбракованный клапан в положение переадресации. Количества совместного Caine и бензоилэксгониной в жидкости организма определяются mea- Suring высот пиков (или зоны) препарата, производное мета- bolite, а также их внутренние стандарты в выбранном ионном токе про- файлов, касающиеся соотношения высот пиков для калибровки графиков (Глава 2). Расчет концентрации жидкости тела кокаина и бензоилэксгониной пути деления измеренного количеств этих соединений с помощью точного объема жидкости организма, извлеченного.

Обсуждение процедуры экспериментальной

Бензоилэксгонина должна быть преобразована в летучую производную, прежде чем он может быть газовой хроматографией. были использованы различные методы дериватизации, в том числе метилирования к кокаину (36,37,41), propylation путем обработки 1-иодпропана (42), алкилирование с pentafluoro-

бензилбромид (17), и этилирование обработки диазоэтана (38) или экстрактивным алкилирование с помощью йодистого (43,49). Метод дериватизации, описанная здесь, является простым и эффективным, если процедура выполняется точно. Реакции N, N-диметил- формамид ди-н-пропил-ацеталь с бензоилэргонина является быстрым и кван- ственной, если реакционная смесь нагревает до достаточно высокой температуры (~ 150 ° C). Температуры такого масштаба ently достигается удобно строить путем многократного прохождения нижней части реакционной трубки медленно через кончик маленького, открытого пламени, пока реакционная смесь не начнет кипеть. Эволюция белого пара будет происходить. Если все летучие растворители (хлороформ и изопропанол) не были удалены перед добавлением дериватизирующим агентом,

Другое N, N-диметилформамид ацетало было опробовано, но ди-н-пропил-ацеталь была выбрана потому, что он дает бензоилэргонина сложному эфир, который имеет особенно подходящее время удерживания под газом хромы указанной хроматографическая условия. -N, N-диметилформамид-ди-н-пропил-ацеталь был приобретен у фирмы Aldrich Chemical Company, мил- Waukeg, WI 53233. Некоторые трудности были столкнулись с примесями в образцах этого реагента, приобретенного у другого поставщика.

Рисунок 1 сравнивает электронного удара (EI) и химическое ioniza- ние (CI) масс-спектры кокаина. Соответствующие масс-спектры пропилового эфира бензоилэргонина аналогичны за исключением того, что обильные ионы в спектрах ДИ масс сдвигаются 28 дальтон выше. ДИ масс-спектр получал с использованием кокаина метана и аммиака в качестве газообразных реагентов показывает только один обильный ион, который соответствует протонированному молекулярному иону (m/z 304). Протонированный пик молекулы ионов в массе-спектре CI метана имеет относительную интенсивность около 50 процентов от базового пика при m/z 182, что соответствует осколочному иону в результате потери бензойной кислоты из протонированного иона молекулы. Спектр EI масса имеет умеренно обильный ион при m/z 182, которые могут быть использованы для анализа выбранного мониторинга ионов кокаина,

Если только ионы протонированной молекулы контролируется, метан-аммиачный ДИ дает о трехкратный улучшении чувствительности над CI метана. ДИ метан-аммиак также дает самую высокую selecti- VITY. С другой стороны, когда одна метан используют в качестве газа-реагента, ионные массы, соответствующие как протонированного молекулярного иона и $MH^+ - PhCO_2H$ ионный фрагмент можно контролировать. Это про- см дополнительную уверенность в количественных результатах, поскольку любые совместное элюированием экстракта компоненты вряд ли будет способствовать в равной степени ионных токов на оба ионных массы наблюдаемых.

На рисунках 2 и 3 показаны типичные графики калибровки, полученных с использованием процедур экстракции 1 и 2, соответственно. В таблице 1 приведены данные точности и точности, полученные с использованием обоих процедур.

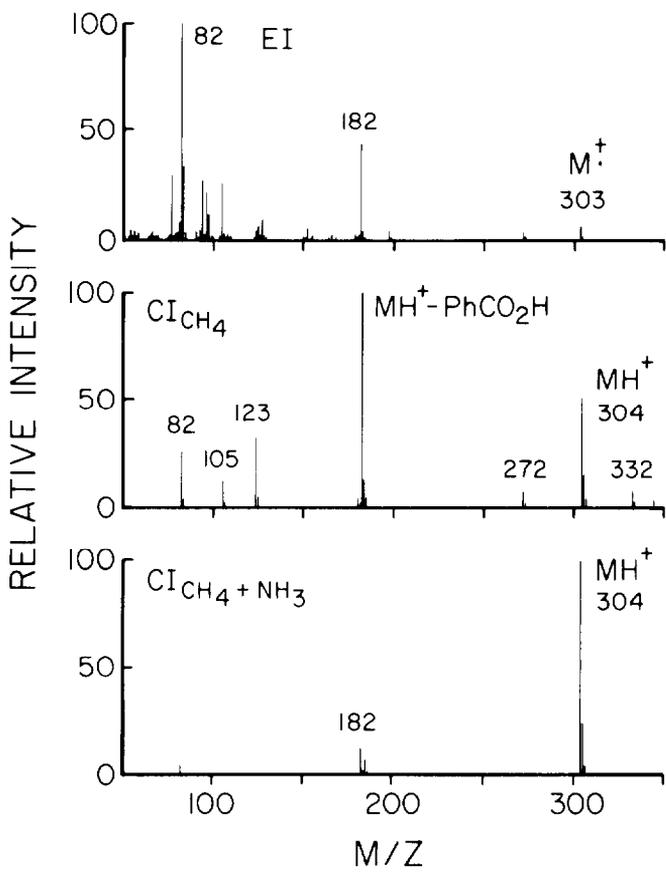


Рисунок 1. Масс-спектры КОКАИНА

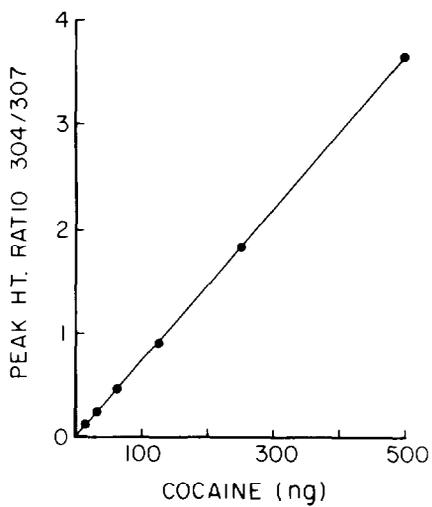
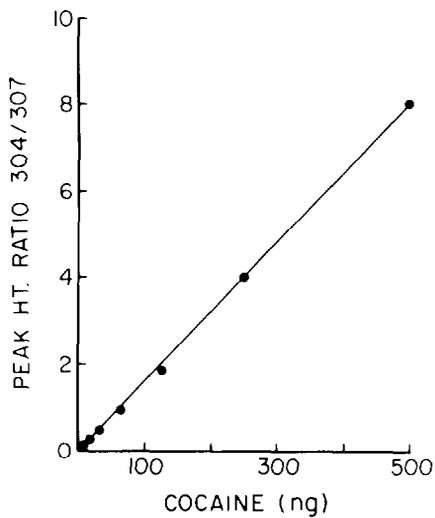


РИСУНОК 1. Калибровочный график ДЛЯ АНАЛИЗА КОКАИНА В ПЛАЗМЕ по методике 1



Фиг.3. Калибровочный график ДЛЯ АНАЛИЗА В ПЛАЗМЕ по методике 2 КОКАИН

	<u>Drug</u>	<u>Spiked Value (ng/ml)</u>	<u>N</u>	<u>Mean Measured Conc. (ng/ml)</u>	<u>Coefficient Of Variation %</u>
	<u>Within-Run</u>				
<u>Proc. 1</u>	Cocaine	75	10	74.6	2.1
<u>Proc. 2</u>	Cocaine	290	10	296	2.2
	Benzoyl-ecgonine	660	10	657	2.3
	<u>Run-to-Run</u>				
<u>Proc. 1</u>	Cocaine	75	10	78.2	4.6
<u>Proc. 2</u>	Cocaine	290	10	285	5.4
	Benzoyl-ecgonine	660	10	675	3.9

Тела концентрации жидкости кокаина и бензоилэкгонины иногда превышает 1 мкг / мл. Когда это происходит, образец должен быть разведен с помощью измеренного количества дистиллированной воды, так что в результате концен- трация находится в диапазоне от 0 до 1000 нг / мл. Разбавленный образец затем может быть проанализировано, как описано.

Кокаин, и в меньшей степени бензоилэкгонины, могут подвергаться энзима- крестики и / или химического гидролиза (54). Скорость химического гидролиза значительно ускоряется при щелочном pH. Так, например, при pH 9,8, 40 процентов кокаина в растворе 3 мкМ превращают в бензоил- экгонин в 1 ч при 37 ° C (54). Кроме того, бензоилэкгонин в метаноле может подвергаться геестрификация к кокаину, особенно, если кислота присутствует. По этим причинам, все образцы жидкости организма, подлежащие проанализированные для кокаина должны быть стабилизированы с помощью фтористого натрия и хранили в замороженном состоянии. Водные растворы кокаина и бензоилэкгонины и метанольных растворов бензоилэкгонины следует хранить в холодильнике и не дольше, чем на несколько дней.

Физические, химические и спектрометрические данные кокаиновой

Номенклатура

Химическое название: 3-бензоилокси-8-метил-8-азабицикло [3.2.1] октан-2-метилвый эфир карбоновой кислоты

Эмпирическая формула: **C₁₇ H₂₁ N O₄**

Количество химического реестра: _____ 50-36-2 Физические

константы _____

Внешний вид: белый кристаллический порошок

Температура плавления: _____ 98 & deg; C

Точка кипения: _____ 187-188 ° C при давлении 0,1 мм

Удельное вращение: _____ $[\alpha]_D^{20} = -16^\circ$ (с = 4 в хлороформе)

Растворимость: 1 г кокаина растворяется в 600 мл воды, 6,5 мл этанола, 0,7 мл хлороформа и 3,5 мл диэтилового эфира.

pKa 8.70

УФ-поглощение: _____ λ макс = 231 нм (лог = 4,2) и 276 нм (лог = 3.0) _____ E

Физические, химические и СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ДАННЫЕ ДЛЯ бензоилэкгонина

Номенклатура

Химическое название: 3-бензоилокси-8-метил-8-азабицикло [3.2.1] октан-2-карбоновая кислота

Эмпирическая формула: **C₁₆ H₁₉ N O₄**

Количество химического реестра: _____ 519-09-5 Физические

константы _____

Внешний вид: белый кристаллический порошок

Температуры плавления: _____ 195 ° C с разложением, то тетрагидрат плавится при температуре 86 ° C

Удельное вращение: _____ $[\alpha]_D^{15} = -45^\circ$ (с = 3 в этаноле)

Растворимость: _____ Очень растворим в горячей воде, растворим в этаноле, нерастворим в эфире

УФ-поглощение: _____ λ макс = 234 нм и 275 нм (в 0,1 NH₂ SO₄)

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. RC Петерсны и RC Стиллман, ред Кокаин.: 1977. На- онный институт по борьбе со злоупотреблением наркотических средств Исследовательской монографии 13, DHEW Pub. (ADM) 77-432. Supt. из Docs., США правительственных служб. Распечатать. Выкл., Вашингтон, округ Колумбия (май 1977).
2. С. Коэн. J. Amer. Med. Assoc., 231, 74 (1975).
3. GR Gay, CW Sheppard, DS Инаба и JA Newmeyer. Int. J. Склонность, 8, тысяча двадцать семь (1973).
4. Т. Харвуд. По борьбе с наркотиками, 1, 20 (весна 1974 г.).
5. RB Резник, RS Kestenbaum и LK Шварц. Наука, 195, 696 (1977).
6. Д. Тейлор, В. С. Эстевес, LF Englert и BT Но. Местожительство Commun. Химреагент Pathol. Pharmacol., 14, 249 (1976).
7. EG Leighty и AF Фентимэн, Jr. Res. Commun. Химреагент Pathol. Pharmacol., 8, 65 (1974).
8. RL Ястребов, IJ Колин, RW Colburn и NB Thoa. Life Sciences, 15, 2189 (1974).
9. Т. Инаба, DJ Stewart, и В. Kalow. Clin. Pharmacol. Ther., 23, 547 (1978).
10. А. Л. Мишра, П. Наяк, Mule. MN Patel, NL Vadlamani и SJ 1312 (1974). Experientia, 30,
11. РК Наяк, А.Л. Мишра, Ther., 196, 556 и SJ мул. J. Pharmacol. Exp. (1976).
12. AL Мишра, MN Patel, VR Alluri, SJ Mule и ПК На- як. Xenobiotica, 6, 537 (1976).
13. AL Мишра в SJ мул, изд, Кокаин.: Химических, биологических, клинических, социальных и лечение аспектах. CRC Press, Cleve- земля, ОН, стр. 73 (1976).
14. Р. Бик и С. Ван Дайк в RC Петерсен и RC Стиллман, ред Кокаин.: 1977, гл. V. См ссылки 1.
15. С.van Dyke, Р. Бик, П. Бараш, П. Jatlow. Clin. Chem :, 23, 241 (1977).
16. Его Гамильтон, JE Уоллес, EL Shimek, Jr., P.Land, SC Харрис, и JG Кристенсен. Дж судебной Sci., 22, 697 (1977).
17. MJ Коган, К. Verebeу, AC DePace, RB Резник, С. J. мул. Анальный. Chem., 49, 1965 (1977).

18. Р. Бик, П. Jatlow, Бараш и С. Ван Дайк. Psychophar- MACOL. Bull., 12, 47 (1976). _____
19. С. Van Dyke, Бараш, П. Jatlow и Р. Бик. Наука, _____
191, 859 (1976).
20. BS Finkle и KL МакКлоски в RC Петерсен и RC Still- человека, ред. Кокаин.: 1977, гл. VIII. См ссылки
1. _____
21. PI Jatlow и DN Бейли. Clin. Chem., 21, 946 (1975). _____
22. СО Джавайд, Х. Dekirmenjian, Дж.М. Дэвис и CR Шустер
J. Chromatogr., 152, 105 (1978).
23. Н. Bronisz, Б. Wysocka, В. Рушецкий. Disserationes Pharm., _____
15, 343 (1963).
24. LA Woods, J. Кочин, EJ Fornefeld, FG McMahon и MH SeEVERS. J. Pharmacol. Exp. Ther., 101, 188
(1951). _____
25. LA Woods, FG McMahon и MH SeEVERS. J. Pharmacol. Exp. Ther., 101, 200 (1951). _____
26. SJ мул. J. Chromatogr., 55, 255 (1971). _____
27. Н.Н. Valanju, М.М. Бадене, С.Н. Valanju, Д. Маллиган и SK Верма. J. Chromatogr., 81, 170 (1973).

28. ML Бастос, Д. Jukofsky и SJ мул. J. Chromatogr., 89, 335 (1974). _____
29. JE Уоллес, ОН Гамильтон, Х. Schwertner, DE King, JL McNay и К. Блюм. J. Chromatogr., 114,
433 (1975). _____
30. KK Kaistha и P. Tadrus. J. Chromatogr., 135, 385 (1977). Syva Corp. Palo Alto, CA 94304.
- 31.
32. Roche Diagnostics. Nutley, NJ 07110.
33. SJ Mule, Д. Jukofsky, М. Коган, А. DePace и К. Verebey. Clin. Chem., 23, 796 (1977).

34. JM Мур. Clin. Chem., 21, 1538 (1975). _____
35. ML Бастос и DB Хоффман в SJ мул, изд. Кокаин.: Химических, биологических, клинических,
социальных и Treatment нацеливает на стр. 35. См ссылки 13.

36. F. Рыба и WDC Уилсон. J. Chromatogr., 40, 164 (1969). _____
37. F. Рыба и WDC Уилсон. J. Pharm. Pharmacol., _____ 21, 135S
(1969).

38. С. Кунца, Д. Besemer, Н. Макки, и Р. Филлипс. *J. хроматограф matogr.*, 85, 75 (1973). _____

39. RH Хаммер, JL Templeton и HL Panzik. *J. Pharm. Sci.*, _____
63, 1963 (1974).
40. F. Medzihradsky и PJ Дальстрем. *Pharmacol. Местожителство Commun.*, _____
7, 55 (1975).
41. JE Уоллес, HE Гамильтон, DE король, DJ Бенсон, HA Schwertner и SC Харрис. *Анальный. Chem.*, 48, 34 (1976). _____
42. DL фон Mindel и Н. А. Д'Амато. *Анальный. Chem.*, 49, 1974 (1977). _____
43. JC Valentour, B. Аггарваль, MP McGee и SW Goza. *J. Anal. Toxicol.*, 2, 134 (1978). _____
44. BH Dvorchik, SH Миллер и WP Грэм. *J. Chromatogr.*, _____
135, 141 (1977).
45. JW Blake, RS Ray, JS Нунан и PW Murdick. *Анальный. Chem.*, 46, 288 (1974). _____

46. JI Javaid, X. Dekirmenjian, E. Brunngraber и JM Дэвис. *J. Chromatogr.*, 110, 141 (1975). _____
47. П. И. Jatlow, К. Ван Дайк, П. Бар-яень, и Р. Бик. *J. хроматограф matogr.*, 152, 115 (1978). _____

48. SP Джиндэл, Т. Лутц и П. Vestergaard. *Biomed. Масса Spectr.*, 5, 658 (1978). _____

49. SP Джиндал и Р. Vestergaard. *J. Pharm. Sci.*, 67, 811 (1978). _____
50. JE Graas и E. Уотсон. *J. Anal. Toxicol.*, 2, 80 (1978). _____
51. AP Graffeo, ДВК Лин, и RL Фольц. *J. Chromatogr.*, _____
126, 717 (1976).
52. SJ мул, ML Бастос, Д. Jukofsky и E. Саффер. *J. хромо matogr.*, 63, 289 (1971). _____

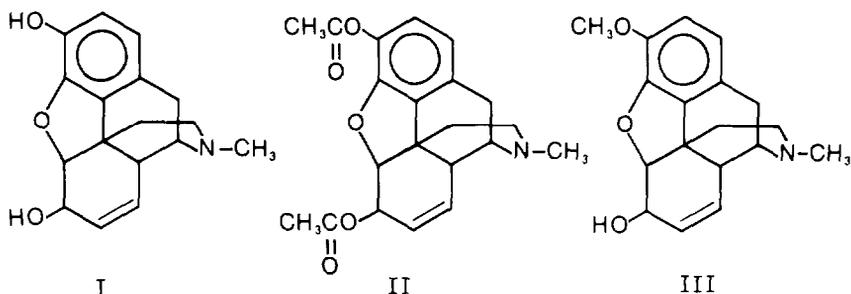
53. . SJ мул, изд Кокаин: химические, биологические, клинические, социальные, и лечение
аспекты. См ссылки 13. _____
54. DM Chinn, DJ Crouch, MA Торф, BS Finkle и ТА Дженнисон. *J. Anal. Toxicol.*, 4, 37 (1980). _____
55. DJ Стюарт, Т. Инаба, ВК Тан и W. Kalow. *Науки о жизни*, _____
20, 1557 (1977).
56. П. Jatlow в SJ Mul, изд, Кокаин: Химических, биологических, клинических, социальных и
лечения аспекты, стр. 61. См ENCE 13 Лите- _____

Морфий

Археологические и исторические данные свидетельствуют о том, что опиум использовался в качестве обезболивающего средства, по крайней мере, до н.э. третьего века и, вероятно, еще в конце бронзового века в Европе. Рфине I морально, пентациклический алкалоид и главный активный компонент опиума, был выделен в 1805 году немецким фармацевтом, хотя правильная химическая структура (I), была впервые предложена в 1923 г. Общего синтеза была достигнута в 1952 году (1).

В дополнении к обезболиванию I морально

Rфине вызывает побочные эффекты, такие как запор, вялость и пау- море, и очень многие производные были синтезированы в рамках усилий по изменяющим или антагонистам некоторых фармакологических эффектов морфия (2).



Героин (3,6-диацетилморфин, II), была введена в 1898 году было более эффективным анальгетиком, чем морфин, но вскоре стала ясной, что героин был более токсичным и получают физическую зависимость и толерантность более быстро, чем морфин. Злоупотребление героина возросло в период между мировыми войнами (1920 до 1935) и снова после того, как

1968. К 1974 году американское Бюро по борьбе с наркотиками оценкам, насчитывалось более 400 тысяч героиновых наркоманов в Соединенных Штатах (1). Несмотря на объемистых опубликованных данных, отражающих тысячи животных и человека экспериментов в течение последних 40 лет, механизм героина и морфина зависимость еще не понят.

Кодеин (III), широко используемый метиловый эфир морфина, обладает более мягким обезболивающим и респираторных депрессанты эффекты, и является эффективным кашля.

Это деметируется в естественных условиях и столько, сколько 17 процентов от заданной дозы может появиться в моче как морфин (3).

Третичная аминогруппа счетов для основных свойств молекулы морфина. Природный морфин и его соль сильно левовращающие. D-изомер был синтезирован, но не имеет незначительную фармакологическую активности (1).

Фармакокинетика и метаболизм

Из-за сравнительную отсутствие сердечно-сосудистых эффектов, Phine И морально был восстановлен в качестве основного дополнения к анестезии, stimulat- Инг кинетических исследований у людей (4). Максимальный фармако- логического эффект морфина происходит в течение нескольких минут после внутривенной инъекции, что соответствует максимальной измеренной концентрации свободного лекарственного средства в плазме крови (5). Клиренс морфина из крови происходит быстро, при этом около 80 процентов от введенной дозы выводится с мочой в течение 8 ч, хотя следы могут быть обнаружены 72-100 ч после введения, особенно в наркоманах. Долгое время удерживания обычно связывается с белком связывания, но есть также вероятность реабсорбции морфина из слизистой оболочки кишечника после гидролиза конъюгат, перемещаемых из печени в желчи (1). После внутривенного введения, плазма полураспада от 2 до 3 ч, а время очистки от 10 до 44 ч, были определяли с помощью радиоиммуноанализа (РИА), но техника РИА не различает свободных и конъюгированных форм препарата (4,5). После внутривенного введения 10 мг доз для взрослых добровольцев, концентрация сыворотки морфина колебалась от

0,04 до 0,10 мкг / мл через 2 часа и упал на 0,002 до 0,007 мкг / мл после 12 ч (5). Морфин быстро всасывается после внутримышечной или подкожной инъекции с максимальным фармакологическим эффектом от 60 до 90 мин после введения, опять же, соответствующего самой высокой концентрации лекарственного средства в плазме (6).

Вероятно, из-за его высокой рКа (9,85), морфин плохо всасывается из желудка. Максимальная концентрация в плазме свободного морфина после перорального введения в сравнительных экспериментах были меньше, чем 20 процентов, что получено при внутривенном введении той же дозы. Кроме того, концентрация конъюгированного лекарственного средства в сыворотке 1 ч после перорального приема была в 16 раз выше, чем концентрации свободного морфина, что свидетельствует о высоком печеночной экстракции соотношения (5). В случаях передозировки наркотиков, минимальное летальный концентра- ции морфина было сообщено, как 0,2 мкг / мл в крови или 0,2-

0,4 мкг / г в мышцах. Для наркоманов, цифры выше. В одном случае, наркоман, который умер от других причин имела концентрацию морфина в крови 2,8 мкг / мл (7). Концентрации мочи не показывают корреляция с летальностью (7).

Было высказано предположение, но unsubstantiated, что в некоторых острых случаях смерти от передозировки героина, токсичные вещества, таких как хинин может быть первичными агентами в смертельной реакции (8). Острая угнетение дыхания также было предложено в качестве вероятного механизма героина смертей от передозировки, особенно в тех случаях, когда лекарственное средство присутствует в комбинации с другими ЦНС депрессантов, таких как алкоголь (9).

Морфин не обладает функциональными группами, которые легко подвергаются гигиеническому drolysis. Героин, однако, быстро гидролизуются. Менее пол рный, чем морфин, он обладает высокой липид и мембранной растворимости, которые могли бы объяснить быстрое поглощение и прохождение через гематоэнцефалический барьер. Основные фармакологические эффекты героина, однако, из-за 6-мопoасetyl-морфин (6-MAM) и морфин; период полураспада самого героина в крови меньше, чем 20 мин, а основной канал про- очищая кровь представляет собой 6-MAM. Его присутствие в плазме можно считать презумпцию доказательства употребления героина (10). Из 6-MAM

преобразуется в морфин в печени, анализ мочи человека после введения героина приводит в первую очередь морфин в том же соотношении свободных к конъюгированной форме, как видно после парентерального введения морфина, т.е. около 1,9 (1). Тем не менее, присутствие 6-МAM и его 3-глюкуронид в моче человека были сообщены после внутривенного введения героина, в количествах, represent- ING менее чем 5 процентов от дозы (11). В исследовании кинетики героина в организме человека, было установлено, что выделение с мочой полураспада свободного морфина быть 1,3 ч; 6-МAM, 1,3 ч; конъюгатов, 2,8 ч; и от общего норморфина, 2,7 ч (12).

Метаболизма морфина в человеке суммированы в таблице 1. син- тетический реакции отвечают за детоксикацию путем преобразования морфина или его метаболитов, в том числе норморфин, чтобы легко выводится из организма водорастворимые соединения, такие как 3- и 6-глюкуронидов и 3-сульфата, с помощью микросомальных ферментных систем в печени, головном мозге, почках и кишечнике. Количественно небольшие синтетические реакции включают метилирование норморфин и 3-0-метилирование к Rhine И морально кодеин (1). 0-метил-трансферазы активность, которая pro- Duces кодеин увеличение наркоманов, факт, что предполагает измененную обмен веществ в длительном применении опиатов и возможный маркер для злоупотреблений (13). Норкодеин, основной метаболит кодеина в человеке, также были выявлены в моче некоторых наркоманов, употребляющих героин, в количествах, пропорциональных к образованию кодеина из морфина (14).

Максимальное восстановление сообщили морфин и продукты биотрансформации составляет менее 85 процентов от дозы, с экскрецией линей ным связанной с выходом мочи (15). Хотя небольшие количества морфина и его метаболитов устраниаются в кале и слюне, метаболический судьба 15 до 20 процентов введенного препарата остается неизвестным.

АНАЛИТИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА

Тонкослойная хроматография (ТСХ) была наиболее часто применяется метод качественного (скрининга) обнаружения морфина; это RA- PID, чувствительный и экономичный. Технические усовершенствования в системах растворителей,

плиты, листы, спреи и регулярно появлялись в современной литературе (16,17). Например, пикограммовых количества морфина в моче или мозга гомогенатах были обнаружены на полиамидных пластин путем предварительной обработки экстрактов н-бутанола с дансилхлорида к Фонп высоко флуоресцентного производного морфина, который может быть визуализированы на высушенных пластин под действием ультрафиолетового света (18) , Спектрофотометрические методы основаны на преобразование морфина к флуорофоре, возбуждению и измерению излучения на конкретных длины волн. Большинство методов используют окисление морфина псевдобыстроту dotomorphine феррицианида калия в слабо щелочном растворе, и достичь уровней обнаружения, как низко как 0,1 мкг / мл (19). Флуоресцентный также может быть достигнуто без феррицианида **калия путем обработки экстракта (хлороформ: изопропанол, 3: 1) с концентрированной H₂ TAK₄, затем концентрируют NH₄ OH и автоклавирование в течение 15 мин при 120 ° C. Последняя процедуру можно автоматизировать для применения в большое количество образцов на с уровнями обнаружения 0,2 мкг / мл (20).** Как мало, как 10 нг морфина в плазме был обнаружен в модифицированном методе, который пред-cipitated белками плазмы до экстракции, используется только силицированного

изделия из стекла, и снижение реакционного объема до 40 μ l с целью повышения чувствительности. Показания были сделаны на фильтровальной флуорометре (21). Поскольку распад pseudomorphine флуоресценции быстро, флюометрия в значительной степени ограничивается качественным использованием. Тем не менее, сопряжения photofluorimeter к компьютерной системе, которая считывает кинетику реакции в течение 3 миллисекунд перемешивания, показал про- Mise в качестве количественного метода (22).

Количественный спектрофотометрический метод, с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии окисленного экстракта мочи с меж- конечного стандартом дигидроморфина, был разработан (23). Смешанная форма гидролизованной мочи и дигидроморфин экстрагировали смесь хлороформа: изопропанол (9: 1) и смешивают с феррицианидом калия непосредственно перед инъекцией на пористую колонку с диоксидом кремния, соединенной с установленным на флуориметр

λ_{ex} 320 нм и 436 нм емл растворитель

Система содержала метанол: 2 N NH₄ OH: 1 N NH₄ HET₃ (30: 20:10). Была линейная зависимость между количеством морфина в исходном растворе и отношением пиковой эмиссии высоты смешанного димера (pseudomorphine + pseudodihydromorphine), образующийся при окислении в том, что флуоресцентном стандарте дигидроморфина. Это позволили калибровка подходит для количественного анализа с Чуткостью 0,01 мкг / мл. Метод имеет то преимущество, что весьма специфичны для морфина.

Вмешательство других препаратов, разделительная перегородка

cularly нормморфин, N-аллил нормморфин, дигидроморфин, и 6- monoacetyl морфина является потенциальной проблемой в других флуорометрических процедурах из-спектров излучения, идентичных pseudomorphine. В этих случаях флюометрия должна быть объединена с хроматографическим ФКМКОМ разделением (19).

Иммунологические разработанные для морфина включают свободный радикал метод анализа (Frat), который использует спиновое мечение с нитроксильными-мечеными препаратами и чувствителен к 0,5 мкг / мл морфина; фермент, умноженной метод иммуноанализа (EMIT), в котором морфин, конъюгированный с лизоцима и сочетание меченого препарата с антителами к морфину делает фермент неактивный; радиоиммуноанализ (РИА); и гемагглютинации ингибирования (III), в котором наличие морфина в исследуемом материале предотвращает агглютинацию морфин покрытием красных кровяных клеток с помощью antimorphine антитела. Главное преимущество является то, что иммуноанализы Biofluids может быть проверен непосредственно, без экстракции образцы на PLE или концентрации. Они также могут быть чрезвычайно чувствительны, обнаружение всего лишь 0,03 мкг / мл морфина (RIA и HI), и быстро (от 2 до 4 мин для EMIT и Frat) (17). Однако, иммунологические подвержены перекрестной реактивности с препаратами аналогичного молекулярной структуры. Морфин антитело, как было показано в реакцию с со- DEINE, декстрометорфан, петидином, dihydromorphinone, пропоксифно, диаморфинами, и 6-MAM (24,25). Попытки уменьшить перекрестные реакции дали антисыворотки поднятые против различных гаптенов: анти-сыворотку к конъюгат 6-сукцинил морфина с бычьей сывороткой в album- реагируют лишь незначительно с морфином глюкурономидом и были использованы для измерения свободного морфина в сыворотке пациентов, получающим пероральные дозы, на уровне обнаружения 0,3 нг / мл (24). Другие пытались гаптены включили морфин-3-глюкурономид и оксиморфона-6-карбокси-метоксим (26). Гаптены, как правило, присоединены к носителю на одном из атомов углерода, морфина,

Теп к атому азота pomorphine. Антитело, полученное не реагировало с кодеином или с 3-0-monooglucuronide морфина, и обнаружено 15 мкг морфина в присутствии кодеина (27). Антисыворотка специфична для кодеина также сообщалось, получают из конъюгата с использованием N-butyroylnorcodeine в качестве гаптена (28). В то время как иммунологические, особенно RIA, может быть адаптирована к количественным исследованиям по подготовке калибровочных графиков, отсутствие абсолютной специфичности остается проблемой. Тем не менее, твердофазный РИА, который включает поглощение антител к полимерным поверхностям, были адаптированы для морфина анализа с использованием антитела к pomorphine-6-полусукцината очищает с помощью аффинной хроматографии. Анализа сообщается реагировать до всего лишь 0,5 нг морфина на мл сыворотки (29).

Газовая хроматография (АГ) может быть использована для скрининга Biofluids, но из-за относительно длительного времени, необходимого для завершения ГХ скопического анализа, он чаще используется для подтверждения результатов ТСХ или иммунологического анализа, и для количественных исследований в фармакокинетике и мета- результате закупорки. GC системы, оснащенные пламенно-ионизационный детектор (FID) GC- достаточно чувствительны, чтобы обнаружить 15 нг / мл морфина. Конверсия 3 α -морфина, извлеченный из желчи, мочи, крови или печени до менее полярного производного диацетила (героин) может увеличить чувствительность GC-FID до 1 нг (17). Полярность морфина, что приводит к адсорбции в колонке GC, также может быть изменена путем силилирования. Процедура дериватизации с использованием бис (триметилсилила) амид trifluoroaceta- (БСТФ) плюс 1 процент триметилхлорсилана в качестве как растворитель и силилирующий агент, как сообщается, дает 100-процентное превращение морфина в его бис- (триметилсилили) эфир в течение 20 мин при комнатной температуре (30). Бис (0-триметилсилил) морфин может быть также образован количественно и воспроизводим путем одновременного введения trime-thylsilylimidazole и лекарственным раствором на колонку газового хроматографа (31).

Количественный метод ОГО разработан для героина и 6-monoacetyl Phine в И морально плазме, используемой детектор щелочи пламени (азот / фос- фора детектор). Образцы плазмы при pH 9,0, содержащих ethylmor- Phine в качестве внутреннего стандарта, экстрагируют бензолом, и высушенные экстракты хроматографируют как их ацетилированные производные после обработки ангидридом трифторуксусной кислоты-бензол (1: 5). Детектор щелочи пламени допускает количественное определение концентрации лекарственного средства, как низко как 100 нг / мл, с обнаружением 20 нг / мл. Извлечение было сделано быстро после венепункции, чтобы избежать в пробирке ферментативного гидролиз соединений (32).

Обнаружение захвата электронов (ГЙ-ECD) было использовано для количественного определения морфина после преобразования в галогенсодержащие производные (33-37). В одном из процедуры налорфина было добавлена в качестве внутреннего стандарта, и морфин и налорфины были трифторацетилюют после экстракции из 1-2 мл сыворотки или плазм с 10-процентным изобутанолом в хлороформе, обратной экстракция с 0,5 N HCl, и реэкстракцией с 10 процентов изопропанол в этилацетате. С₆₃ Детектор Ni сообщалось предел чувствительности 25 нг / мл в сыворотке (33). Усовер- Ment техники ECD, используя H-ECD, обнаружено 0,5 нг / мл морфина в плазме экстрактов и 0,1 нг морфина в 30 мг мозга tis- в суд от крыс. Образцы экстрагировали толуолом: бутанол

(9: 1) при pH 8,9, обратно экстрагировали в 0,1 NH₂ TAK₄, и экстрагируют толуолом: бутанол. Морфин и внутренний стандарт (nalor- Phine) были получены производные с пентафторпропионовым ангидридом (34). Оба морфин и кодеин были количественно путем дериватизации с пентафторпропионова ангидрида и анализа с помощью ГХ-ECD с использованием « Детектор Ni. Пределы обнаружения были 2 пг для морфина и 20 мкг для кодеина в исследуемых растворах (35).

Способ ГХ-ECD, который может анализа, как мало, как 0,1 нг / мл морфина в моче человека было сообщено (36). Морфин превращает в его производное heptafluorobutyl для разделения GC на 3 процента OV-17 после экстракции этилацетата в 2 мл мочи подщелачивала. Кодеин был использован в качестве внутреннего стандарта. Предел чувствительности сообщалась для этой процедуры составил 100 мкг морфина / мл мочи. Фторированные производные также были подготовлены для количественных исследований ОГО-ECD морфина, кодеина, и 6-МAM, присутствующих в качестве примесей в жестокое ICI т героина (37). Гептаформасляная ангидрид (ГФКИ) дает соответствующие производные в течение 5-минутного времени реакции, а также производные были получены из Тион бикарбоната натрия ацетонитрил-растворы в петролейный эфир перед хроматографией на 3 процента OV-17 по газу Chrom Q. Morphine, кодеин, и 6-МAM героина было легко измерить при уровнях, как низко как 0,001, 0,01, 0,01 процента, соответственно. Минимальное определяемое количество для каждого соединения составляло ~ 20 пг для морфина, 80 пг для кодеина, и 100 мкг в течение 6-МAM. Однако, когда прокаин присутствовал как примесь, она была высокой реакционной способностью с ГФМК и вызвал значительные помехи с хроматограмм производных heptafluorobutyl.

ГХ в сочетании с масс-спектрометрии (ГХ / МС) предлагает наилучший доступный метод для однозначной идентификации морфина и его метаболитов в биологических материалах.

Он может служить в качестве проверки

Результаты менее чувствительных и специфических анализов, а также как инструмент для положительного подтверждения структур. Методика выбранного мониторинга ионов был применен к количественному анализу и Phine И морально родственных соединений в различных биологических жидкостях (10,38-43).

Морфин измеряли в моче при таких низких концентрациях, как 5 нг / мл с помощью ГХ / МС с химической ионизацией (42). Морфин маркированы с тремя атомами дейтерия на N-метильной группы служили в качестве внутреннего стандарта. После регулировки мочи до pH 8,5 смесь экстрагировали смесью хлороформ: изопропанол (4: 1) и экстракт обрабатывали бис (триметилсилил) ацетамида. В результате бис (триметилсилил) морфин отделяли и измеряли с помощью хроматографии на 3 процента ослабленным OV-17 колонки, поддерживаемой при температуре 230 ° C; отслеживаемые ионы соответствовали двух ионов видим фрагментов [(M-CH₃)⁺ и MH⁺ -HOSi (CH₃)₃] в ионизационной масс-спектров химического метана дериватизированного лекарственного средства и дейтерированного внутреннего стандарта.

Морфин и кодеин были измерены одновременно в крови с помощью процедуры, ОЙ / MCA с участием добавления дейтерированного внутреннего стан- Dard в кровь, кислотный гидролиз конъюгат, ряд бывших тяг, чтобы отделить основание от других компонентов экс- тракта , дериватизации с ангидридом трифторуксусной кислоты, и изме- рений на бис (трифторацетил) морфина и моно- (трифторацетил) кодеина с помощью газовой хроматографии (3 процента OV-17, 230 ° c) и электронным ударом масс-спектрометрии (43). Анализ был применен

для анализа 916 проб крови от лиц, задержанных по подозрению в опийной интоксикации. Средняя концентрация морфина была 0,29 мкг / мл. Для большинства образцов кодеина концентрации были примерно от 5 до 10 процентов от морфина концентраций Тиона. Нижний предел приемлемого количественного измерения считается равным 20 нг / мл.

При применении ГХ / МС к изучению взаимосвязи между уровнями мозга морфина и анальгезии у крыс, внутренний стандарт - Дард снова trideuterated морфин и препарат был хромато- рентгенографического в качестве трифторацетил производного (40). Чувствительность была такова, что низкие концентрации морфина, присутствующий в мозге последователей мычания терапевтические дозы могут быть легко измерены, с нижним пределом количественных 8 нг / г ткани.

Свободный и связанный морфин, а также свободный 6-MAM были количественно рован в крови кроликов с **помощью ГХ / МС (10). Trideuterated морфин и 6-MAM-2 ЧАС3 были добавлены к 0,2 мл плазмы перед** осаждением про- теинс с помощью ацетона. Супернатант упаривают досуха в токе азота и остаток растворяют в 2,5 мл 0,1 N HCl и purified двумя экстракций с бензолом. Водную фазу Adjusted до pH 8,5, экстрагируют смесь хлороформ: изоамиловый спирт (3: 1), и выпаривают досуха, прежде чем дериватизации с trifluoroacetic кислоты ангидрида. Производные были взяты в хлороформе для анализа ГХ / МС на 6 футов x 2 мм силанизированы колонку, заполненную 1 процент OV-1 по газу Chrom Q, используя гелий в качестве газа-носителя и колонки температуры 230 ° C. С электронно-ударной ионизацией наибольших интенсивности ионов были связаны с фрагментами при m / z 364 для pro- TiO соединения и 367 для соединения дейтерированного. В качестве теста для свободных и связанных метаболитов героина,

Добывающее алкилирование с пентафторбензилхлоридом (PFB) бромидом, с использованием тетрабутиламмоний (ТБ) в качестве противоиона и этилацетата в качестве золь жерла, было использовано для количественного определения морфина в плазме при концентрациях, как низко как 5 нг / мл (41). С помощью этой процедуры морфина экс зятяжного из водных растворов с эффективностью 98 процентов. Алки- ушной фенольной гидроксильной группы происходило одновременно. Производное ПФБ морфина может затем быть проанализированы непосредственно ГХ / МС. Однако лучшие результаты были получены, если морфин ПФБА дополнительно дериватизированные путем обработкой ангидрида трифторуксусной кислоты. Полученный производное PFB-ТФ подвергали хроматографии на 2 процента OV-17 колонке, поддерживаемой при 245 ° C. Количественное была достигнута путем измерения ионных токов при m / z 380 и 383,

Концентрации Морфин, определяемые спектрофлюориметре в крови и головного мозга были примерно половину, полученные с помощью ГХ / МС (44). Различие может быть результатом интерференции закалики в флуориметрического анализа и большей чувствительности метода ГХ / МС. Гидролиз образцов крови возрос кажущуюся концентрацию морфина примерно на 260 процентов, в то время как соответствующее увеличение в образцах головного мозга было только около 25 процентов. Можно предположить, что увеличение обусловлено гидролизом конъюгата глюкуронида морфина.

Перезарядная ионизация с использованием 10 процентов оксида азота в качестве нитро-ген газа-реагента может предложить преимущества по сравнению с CI или EI ионизации для анализа морфина и героина в этом масс-спектров перезарядки этих соединений показывают меньшую фрагментацию (45). Поле ионизации вызывает также мало или нет фрагментации молекул морфин-типа и может быть использовано для определения следовых количеств лекарственных средств в биологических средах с помощью анализа **изотопного разбавления с multilabeled разбавителями, такими как morphine-2 ЧАС₅ и кодеин-2 ЧАС₈ (46,47).**

Количественные общего морфин в биологических жидкостях требует гигиенического drolisis, чтобы освободить препарат из конъюгат. Ферментативный гидролиз обычно оказывается менее эффективным, чем кислотный гидролиз морфина глюкуронид из-за различия в эффективности между ферментными препаратами. Наиболее эффективное ферментативное восстановление найдено в сравнительном исследовании составило 64 процентов. Критические параметры, включенные выбор буферной системы, pH, температуры и концентрации фермента. Высокотемпературный (автоклавирование или кипячение с обратным холодильником) кислотный гидролиз не требует такого критического контроля условий. Же исследование показало, выход 93 процентов доступного морфина, когда раствор со- ребристый автоклавируют при 125 ° C в течение 30 мин с использованием 8-15 процентов соляной кислоты (48). Однако условия гидролиза варьироваться в широких пределах в литературе,

Процедуры экстракции для морфина также различаются, но из-за его фенольного гидроксила и третичного амина оптимального pH для экстракции 8,5-10 (49). Хлороформ наиболее часто используется в качестве органического золь вентиляционное отверстие, как правило, с добавлением изопропанола (7,15,23), н-бутанол (19,21), или изоамиловый спирт (10) в соотношении или 9: 1 или 3: 1. Восстановление 60-70 процентов сообщалось хлороформ: изопропанол (3: 1) (7). Тем не менее, толуол: бутанол (9: 1) (34), этилацетат: изобутанол

(9: 1) (50), этилацетат + 10 процентов isopropanol (40), бензол (32), эфир (51), и 1,2-дихлорэтан + 30 процентов изопропанол (12) Среди других растворителей сообщалось. Восстановление морфина 85-100 процентов из мочи Утверждалось для системы с участием адсорбции на колонке XAD-2 смолы и elu- ции смеси хлороформа: изопропанол (17).

Исследование (52) методы извлечения морфина из биологического образцы на перед анализом привело к следующим выводам: (1) кислотный гидролиз морфина конъюгат предпочтительно ферментативному гидролизу, если другие препараты кислотно-лабильный не должны быть проанализированы, (2) хлороформ: изопропиловый спирт (4: 1) является экстракция растворитель выбора, поскольку она удаляет большую часть морфина из биологического образца, в одной экстракции и он легко летучий, (3) бикарбонат натрия и карбонат аммония является предпочтительным «посолом из» агентов, и (4) отношение биологического образца к растворителю должно быть примерно 1: 4.

Обзор анализа морфина с помощью методов газовой фазы, в том числе процедуры извлечения из мочи и крови для различных применений biomed- кала и количественного, был опубликован в 1977 году (53).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОЦЕДУРА

Экспериментальная процедура включает в себя одну экстракцию в буфер и соли-насыщенный раствор биологической жидкости с системой растворителей, включающей толуол: гептан: изоамиловый спирт (70: 20:10 об / об).

«Экстракт затем концентрировали и дериватизировали лечение с помощью ангидрида трифторуксусной кислоты. Количественное достигается за счет выбранного иона мониторинга при использовании химической ионизации метана и аммиака в качестве газообразных реагентов.

Стандарты и реагенты

Морфин, используемый в развитии этой процедуры была приобретена у Applied Science Laboratories, State College, PA 16801. Нет примесей были обнаружены либо газовой хроматографии или масс-спектрометрии **trometry**. Морфин метили 3 атомами дейтерия на N-метильной группы (**morphine-2 ЧАС 3**) был подготовлен **опубликованной методике (54,55)**. Масс-спектральный анализ **morphine-2 ЧАС 3** показал, что 94 процентов молекул содержали 3 атома дейтерия, в то время как 0,5 процента не содержал атомов дейтерия. Газовая хроматография указывают на хемадсорбционную чистоту выше, чем 99 процентов.

Подготовка буфера pH 9,6 путем растворения 500 г калия моно- гидрофосфат ($K_2 HPO_4$) примерно в 500 мл дистиллированной воды. Аль- низкий раствору остыть до комнатной температуры, а затем добавить достаточное количество дистиллированной воды, чтобы сделать ровно один литр.

Маточные растворы морфина и morphine-2 ЧАС 3 используется для определения кали- графики расщеплением и подготовить рабочие стандарты готовят следующим образом. Взвешивание в 100-мл мерную колбу около 10 мг морфина и записывают его вес с точностью до 0,1 мг. Растворить измеренный морфин примерно 75 мл метанола, а затем добавить дополнительный метанол, чтобы сделать ровно 100 мл раствора.

В следующих пунктах

это решение будет именоваться как «0,10 мг / мл исходного раствора», хотя оно должно быть меченным с его фактической концентрацией на основе точного измеренного веса морфина. Серия стандартных растворов могут быть получены путем соответствующего разбавления этого раствора, как описано в главе 2.

Исходный раствор morphine-2 ЧАС 3 получают таким же образом. Для измерения морфина в жидкостях тела в пределах диапазона концентраций ции от 1 до 500 нг / мл, добавление приблизительно 40 нг внутреннего стандарта, чтобы каждые мл образца является удовлетворительным. Это может быть удобно сделать **путем добавления 100 мкл 400-нг / мл morphine-2 ЧАС 3**

метанольный раствор на каждый мл образца. Подготовьте / мл раствора внутреннего стандарта 400 нг **путем разбавления 1 мл 0,10 мг / мл исходного раствора morphine-2 ЧАС 3 до 250 мл метанола.**

Хранить запас и стандартные растворы в хорошо закупоренных или заблокированных стеклянных сосудов в темноте при температуре ниже 0 ° C.

экстракция

Передача 1 мл образца (плазма, сыворотка, цельная кровь или моча) в 5 мл со стеклянной пробкой, **коническая центрифужная пробирка. Добавьте 100 мкл 400-нг / мл morphine-2 ЧАС в Внутреннее решение** стандартных и во- текс в течение примерно 10 сек. Разрешить образец для уравнивания в течение 15 **мин, а затем добавляю около 0,5 г твердого хлорида натрия, после чего 1 мл на K₂ HPO₄ буфер (pH 9,6).** Vortex смеси в течение примерно 10 сек. Добавить 1 мл системы растворителей, состоящей из толуола: гептан: изоамиловый спирт в объемном соотношении 70:20:10. Закрывают пробирку и во- текс смесь, по крайней мере, на 30 сек. Фазы разделяют центрифугированием в течение 10 мин. Передача большей части органического слоя (вверху) в 12-мл стакан закупоренном, коническую центрифужную пробирку. Старайтесь не транс- фер любого из водного (нижнего) слоя. Выпаривают органическую экс- тракт только досуха при нагревании до 70 ° C в токе очищенного воздуха. Закрывают пробирку и не хранить в холодильнике, пока незадолго до / МС ГХ-анализ готов быть выполнена. Для derivati- зации, позволяю трубка нагреться до комнатной температуры и затем добавляют 200 мкл хлороформа плюс 100 мкл трифторуксусного ангидрида. Закрывают пробирку и нагревают при 70 ° C в течение 10 мин. Дайте трубку остыть при комнатной температуре в течение 10 мин и затем выпаривают досуха при нагревании при 40 ° C при слабом токе сухого азота или сухого воздуха. Дериватизированный экстракт подвергается разложению при гидролитической длительном воздействии лабораторного воздуха, поэтому важно, чтобы немедленно реконструированной нят остаток в 30 мкл хлороформа и сделать инъекцию в ГХ / МС.

ГХ / МС анализ

Рекомендуемые экспериментальные условия для ГХ / МС анализа производного трифторацетил морфина следующим образом:

колонка GC 1,8 м x колонка 2 монахиной (ID), стекла упакованы с 3 процента OV-17 на 100/120 меш Газ Chrom Q (Прикладные науки Лаборатория, State College, PA 16801)

Газ-носитель: Метан, 15-20 мл / мин

Реагент газ: Аммиак, вводится в ионную камеру, как описано. в главе 2.

Температура: Инжектор, 270 ° C
Колонка, 225 ° C изотермического ГХ / МС
переноса iipe, 260 ° C Источник ионов, 160 ° C

В этих условиях бис- (трифторацетила) морфин должен элюирование при температуре от 2 до 4 мин.

Перед началом ГХ / МС анализ образцов, производительность общей системы ГХ / МС должны быть оценены и оптимизированы descri- кровати в главе 2. Ионы, которые будут происходить при отслеживаемые м / з 478 и 481. Они соответствуют к протонированная молекула ионов для бис- (трифтор-

ацетил) морфин и 2 ЧАС₃- аналог, соответственно. С отбракованных клапана в положении отбракованных, вводят от 2 до 6 мкл вида хлор- раствора экстракта в газовый хроматограф. Примерно через 1 мин, переключить отбракованных клапан таким образом, что весь поток газа-носителя поступает в источник ионов масс-спектрометра и начинают сбор данных. Когда производное морфина имеет elu- Тед, прекратить сбор данных и вернуть отбракованный клапан в положение отбракованного.

Количество свободного морфина в биологическом образце опре- добыто путем измерения высоты (или **участков) из бис- (трифтор- ацетил) пика морфина и тому 2 ЧАС₃- пик аналога в текущих профилях ионных («ионные хроматограммы») и касающиеся соотношения высот пиков к калибровочной графике. Вычислить концентрацию образца свободного морфина путем деления измеренного количества морфина в точном объеме образца, экстрагированный.**

Обсуждение процедуры экспериментальной

Процедура, описанная здесь, является относительно быстрой, но это приводит к высокой чувствительности и специфичности. Концентрации Морфин, как низко как 1 нг / мл может быть измерена точно и помех от других компонентов экстракта редко является проблемой.

Если интерференция *enes* встречаются это может быть возможным, чтобы удалить их incor- porating обратной экстракции в метод. При обратной экстракции желательно, следовать процедуре, описанной ранее в точку, где толуол: гептан: экстракт изоамиловый спирт (приблизительно 1 мл) переносят в 12-мл стакане, закупоренном **конической центрифужной пробирке. Затем добавляют 1 мл 0,2 NH₂ ТАК₄. Закрывают пробирку и встряхните** или вихревое течение по крайней мере 30 секунд. Удалите органический слой (верхний) и нейтрализуют водный слой (нижний) путем добавления 1 мл 0,2 N NaOH. Пропитайте раствор с хлоридом натрия (~ 1 г) и **добавляют 2,0 мл K₂ HPO₄ буфер. Убедитесь, что pH раствора находится в пределах от 8,5 до 9,0, а затем** извлечь морфин с 2 мл толуола: гептан: изоамиловый спирт растворителя. И, наконец, про- Seed с дериватизацией и GC анализом / MS, как ранее обозначение cribed.

Получение бис- (триметилсилили) производный морфин путем нагревания экстракта с бис (триметилсилили) trifluoroacetamide (БСТФ) при 60 ° C в течение 1 ч, является альтернативой образования производного трифторацетили. Оба производных используются с удовлетворительными результатами. Трифторацетилирование происходит несколько быстрее, чем trimethylsilylation. Однако избыток trifluoroacetic ангидрид должен быть удален путем выпаривания до анализа ГХ / МС, чтобы избежать деградации колонки ГХ.

(Введение избытка BSTFA на колонку ГХ не появляется деградировать столбец про- изводительности). На рисунках 1 и 2 показывают ДИ масс-спектры метана-аммиака

бис (трифторацетил) морфин и бис- (триметилсилил) морфин, соответственно. В обоих спектрах только обильные ионы соответствуют ионам протонированной молекулы. Прямое сравнение не было сделано устойчивости этих двух производных морфия, но никаких серьезных различий не стало очевидным до сих пор.

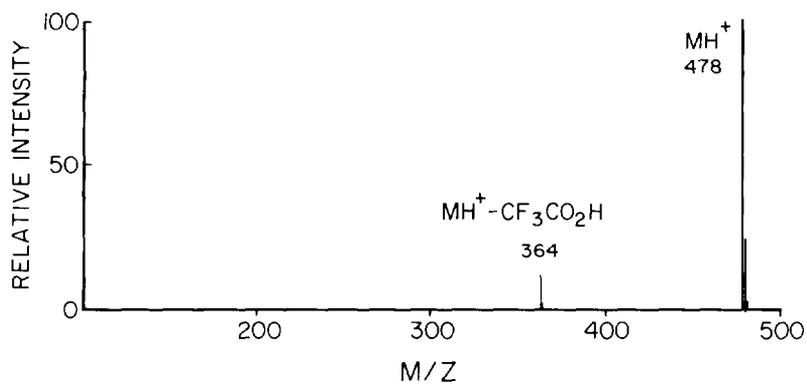


Рисунок 1. метано-АММИАКА ДИ Масс-спектр бис- (три-Фторацетил) МОРФИН

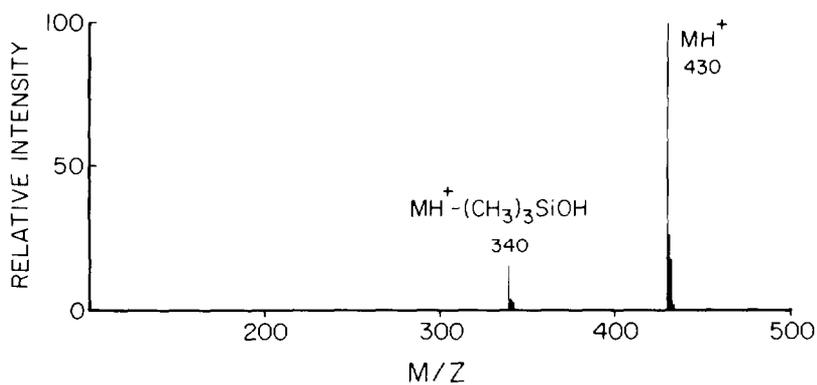


Рисунок 2. метано-АММИАКА ДИ Масс-спектр бис- (три-Метилсилл) МОРФИНА

Описанная здесь процедура измеряет только свободный морфин в жидкости организма.

В моче, большая часть выделяемого морфина присутствует а глюкуронид и сульфат конъюгатов. Следовательно, для того, чтобы измерить полный морфин необходимо гидролизовать закрытый тип морфина сопряженного перед экстракцией. Кислотный гидролиз может быть выполнен следующим образом (43):

Передача 1 мл образца в пробирку 12 мл. Добавьте 100 мкл 400-нг / мл morphine-2 ЧАС3 Внутреннее решение стандартных и vor- текс в течение примерно 10 сек. Разрешить образец для уравнивания в течение 15 мин. Добавить 1 мл 6 N HCl (полученных с помощью 1: 1 разбавлением концентрированной соляной кислоты с дистиллированной водой). Vortex смеси, а затем тепло в кипящей водяной бане в течение 1 часа. После охлаждения до комнатной температуры смесь нейтрализуют путем медленного добавления 1 мл 6 N NaOH. Пропитайте раствор с хлоридом натрия для облегчения экстракции **свободного морфина. Добавить 2 мл K2HPO4 буфер и проверить, чтобы увидеть, что pH смеси составляет** от 8,5 до 9,0. Извлеките морфин 1 мл толуола: гептан: изоамиловый аль-cohol растворителя, и приступить к дериватизации и ГХ / МС скопического анализа, как описано выше.

Другие опийные наркотики, такие как кодеин и 6-мопoасetyl морфина может быть измерено одновременно с помощью описанного метода, если соответствующие аналоги дейтерий-меченных доступны для использования в качестве внутренних стандартов. Протонированная молекула ионов для трифтор ацетил **кодеин и его 2 ЧАС3- аналогового происходить при m / z 396 и 399, respect- ively; в случае производного трифторацетил 6-моно- ацетил морфина и его 2 ЧАС3- аналог, эти ионы возникают при t / г 4,24 и 427. На** рисунках 3 и 4 показаны репрезентативные калибровочные графики для морфина и кодеина в плазме. Графики являются линейными по концентрации лекарственного средства от 1 до 500 нг / мл.

Если более высокие концентрации встречались или ожидалось, образец должен быть разбавлен водой дис- вспаханной с целью снижения концентрации лекарственного средства, так что он падает в пределах линейного диапазона калибровочного графика.

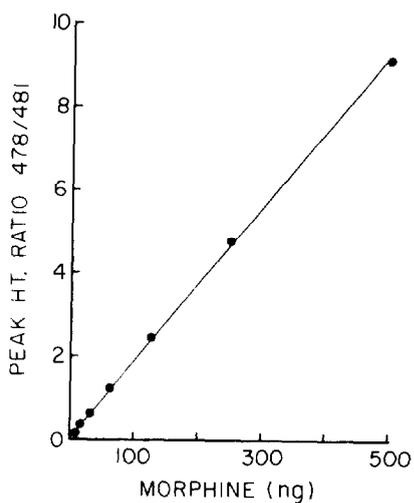
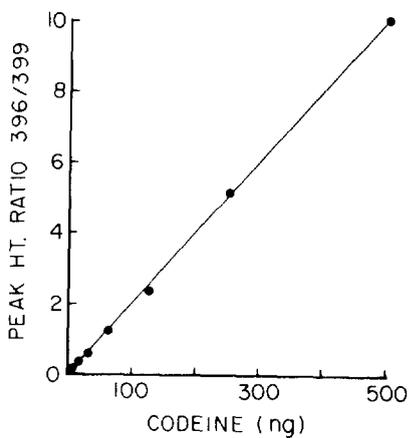


Рисунок 3. калибровочный график ДЛЯ АНАЛИЗА МОРФИНА
В ПЛАЗМЕ



Фиг.4. Калибровочный график ДЛЯ АНАЛИЗА кодеина В ПЛАЗМЕ

Физические, химические и СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ДАННЫЕ ДЛЯ МОРФИНА

Номенклатура

Химическое название: 7,8-Дигидро-4,5-эпокси-17-метил-морфинан-3,6-диол

Эмпирическая формула: C₁₇ H₁₉ N O₃

Номер Chemical Abstracts реестра: _____ 57-27-2

Физические константы

Температуры плавления: _____ 254 ° С с разложением

Удельное вращение: _____ $[\alpha]_D^{25} = -132^\circ$ (метанол)

Растворимость: 1g морфина растворяется в 5000 мл воды при комнатной температуре, 1100 мл кипящей воды, 210 мл этанола, 1220 мл хлороформа, 6250 мл диэтил- эфира, или 10 мл кип щего метанола.

pKa 9,85

УФ-поглощение: _____ λ макс 287 нм (этанол)

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У. Voerner, С. Эббот и Р. Л. Роу. Метаболизм Drug Отзывы, _____
4, 39 (1975).
2. А. Ф. Casy в Д. Clouet, изд наркотические средства: Биохимические Pharmacology. Пленум, Нью-Йорк, гл. 1 (1971).
3. Гдж Маннеринг, АС Диксон, Е. М. Бейкер III и Т. Асы. J. Pharmacol. Exp. Ther., 111, 142 (1954). _____
4. PA Mitenko и ПК Duke. Clin. Исследования, 22, 726A (1974). _____
5. С. Спектор и Л. Vesell. Наука, 174, 421 (1971). _____
6. С. Ф. Brunk и М. Делла. Clin. Исследования, 21, 467 (1973). _____
7. С. Felby, Х. Кристенсен, А. Лунд. Forensic Sci., 3, 77 (1974). _____
8. DC Перри. Clin. Toxicol, 8, 239 (1975). _____
9. JR Monforte. Дж судебной Sci., 22, 718 (1977). _____
10. WOR Ebbighausen, JH Мойот, Х. Stearns, П. Vester- GaaRd. Biomed. Масс-Спектр., 1, 305 (1974). _____

11. SY Yeh, RL McQuinn и CW Городецкий. J. Pharm. Sci., 66, 201 (1977). _____
12. SY Yeh, CW Городецкий и RL McQuinn. J. Pharmacol. Exp. Ther., 196, 249 (1976). _____
13. У. Voerner и С. Эбботт. Experientia, 29, 180 (1973). _____
14. У. Voerner, KL Roe и CE Беккер. J. Pharm. Pharmacol., 26, 393 (1974). _____
15. SY Yeh. J. Pharmacol. Exp. Ther., 192, 201 (1975). _____
16. JF Taylor в D.Clouet ред наркотические средства.: Биохимическая фармакология. Пленум, Нью-Йорк, гл. 2 (1971). _____
17. SJ мул. J. Chromatogr. Sci., 12, 245 (1974). _____
18. НН Л, И.К. X, ТМ чо, и W. Липскомбы. J. Chromatogr., 76, 505 (1973). _____
19. Н. Kupferberg, A. Burkhalter и EL Путь. J. Pharmacol. Exp. Ther., 145, 247 (1964). _____
20. SJ мул и PL Hushin. Анальный. Chem., 43, 708 (1971). _____
21. AE Takemori. Biochem. Pharmacol., 11, 1627 (1968). _____
22. JM Хикс, Р. Sonoff и KJ Koch. Clin. Chem., 20, 901 (1974). _____
23. I. Джейн и JF Taylor. J. Chromatogr., 109, 37 (1975). _____
24. GW Aherne, В. Отмечает, Б. Моррис, Е. М. Piall, JD Робинсон, Р. Г. Twycross. Британия J. Pharmacol., 54, 228P (1975). _____
25. Д. Сон, Дж Саймон, М. Ханна, Г.В. Гали, Р.А. Тольба, и В. Мелконян. Анальный. Chem., 45, 1498 (1973). _____
26. М. Койда, М. Такахаши и Н. Kaneto. Япония. J. Pharmacol., 24, 707 (1974). _____
27. Г. Gintzler, E. Mohacsi и С. Спектор. Europ. J. Pharmacol., 38, 149 (1976). _____
28. JWA Финдли, RF Буц и KM Welch. Life Sci., 19, 389 (1976). _____
29. М. Штайнер и ДЛ Спратт. Clin. Chem., 24, 339 (1978). _____
30. GR Уилкинсон и EL Way. Biochem. Pharmacol., 18, 1435 (1969). _____
31. К. Расмуссен. J. Chromatogr., 120, 491 (1976). _____

32. Д. Смит и WJ Коул. J. Chromatogr., 105, 377 (1975). _____
33. JE Уоллес, ОН Гамильтон, К. Блюм и С. Мелкий. Анальный. Chem., 46, 2107 (1974). _____
34. Б. Дальстрем и Л. Paalzow. J. Pharm. Pharmacol., 27, 172 (1975). _____
35. MJ Коран и М. А. Chedekel. J. Pharm. Pharmacol., 28, 261 (1976). _____
36. Г. Николау, Г. Ван Лир, Б. Кауль и Б. Davidow. Clin. Chem. 23, 1640 (1977). _____
37. JM Мур. J. Chromatogr., 147, 327 (1978). _____
38. WOR Ebbighausen, JH Мойот и П. Vestergaard. J. Pharm. Sci., 62, 146 (1973). _____
39. WOR Ebbighausen, JH Мойот, П. Vestergaard, Н. С. Клайн. Adv. в Biochem. Psychopharmacol., 7, 135 (1973). _____
40. PP HIPPS, MR Eveland, ER Meyer, WR Шерман и TJ Цицерон. J. Pharmacol. Exp. Ther., 196, 642 (1976). _____
41. WJ Коул, Дж Parkhouse и YY Юсеф. J. Chromatogr. 136, 409 (1977). _____
42. PA Clarke и RL Фольц. Clin. Chem., 20, 465 (1974). _____
43. Д. Пирс, С. Wiersema, М. Го и С. Эмери. Clin. Toxicol., 14, 161 (1979). _____
44. Д. Рид. Clin. Toxicol., 14, 169 (1979). _____
45. I. Джардин и С. Fenselau. Дж судебной Sci., 20, 373 (1975). _____
46. М. Анбар и WH Aberth. Анальный. Chem., 46, 59A (1974). _____
47. JA Лоусон, СО Degraw, и М. Анбар. J. Heterocyclic Chem. 13, 593 (1976). _____
48. F. Рыба и TS Hayes. Дж судебной Sci., 19, 676 (1974). _____
49. Т. Хиггинс и JD Тэйлор. Clin. Biochem., 7, 280 (1974). _____
50. GR Накамура и EL Путь. Анальный. Chem., 47, 775 (1975). _____
51. F. Рыба и WDC Уилсон. J. Chromatogr., 40, 164 (1969). _____
52. DB Predmore, GD христианка, и TA Loomis. Дж судебной Sci. 23, 481 (1976). _____

53. JPG Tehnot и КД Haegeler в D. Glick, ред., Методы биохимического анализа, Vol. 24. Interscience,
John Wiley и Sons, Нью-Йорк, стр. 101 (1977).

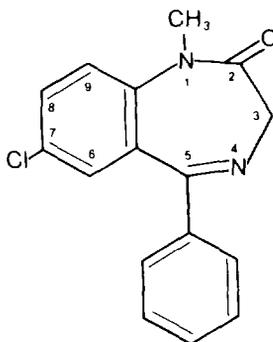
54. С. Elison, HW Эллиот, М. Смотри и Н. Рапопорт. J. Med. Chem., 6, 237 (1963). _____

55. Г. Рапопорт и М. Смотри. В патенте США 2890221; Химреагент Тез., _____
54, 612F (1960).

Диазепам и его основной метаболит, N-Desmethyldiazepam

Диазепам (7-хлор-1,3-дигидро-1-метил-5-фенил-2H-1,4-бензодиазепин-2-он, I), был впервые синтезирован в 1959 году и введен клинически в начале 1960-х годов в качестве седативного агента и повторного лажант мышц (1).

Это может быть синтезировано с помощью реакции 2-метил-амино-5-хлорбензофенона и этиловый эфир глицина, или с помощью множества других маршрутов (2). Диазепам был продан с 1963 года как валиум и стал наиболее часто используемым отпускаемых по рецепту лекарств в западном мире (1).



I

Наиболее важные клинические эффекты препарата опосредованы через центральную нервную систему (ЦНС); лимбической системы мозга, которая контролирует эмоции, участвует в попытках ло- Сате сайт седативного деятельности. Диазепам имеет мышцы Relax- муравьев и сильные противосудорожное свойства также, но сайты действия этих мероприятий не были определены. В отличие от барбитуратов, препаратов класса бензодиазепинов не появляются для получения клинически важных печеночной микросомальной индукции и являются более доброкачественные, чем другие седативно-гипнотических препаратов в отношении сердечно-сосудистой и дыхательной депрессии (1). Толерантность делает религт, однако, так, что большие дозы становятся необходимыми для достижения желаемого эффекта. Последние клинические исследования показали, что чувствительность к ЦНС депрессанты эффектов диазепам увеличивается с возрастом (3). Побочные эффекты терапевтических доз (обычно 20 мг в день или менее) могут включать сонливость, атаксия, дезориентация, головокружение и (4). Существует доказательство для ассоциации между глотанием батарейкой диазепам в первом триместре беременности и заболеваемостью оральных расщелин у детей раннего возраста (5). Однако, из-за его относительно широкий запас прочности, смерть из-за передозировки диазепам редко. Значительное ухудшение психомоторных навыков в дозах 10-20 мг было продемонстрировано в исследовании, связанное с возможностью вождения, и это ухудшение в сочетании с сном индуцирующего эффектом препарата делает его возможный вклад в дорожно-транспортные происшествия импрор. Существует доказательство для ассоциации между глотанием батарейкой диазепам в первом триместре беременности и заболеваемостью оральных расщелин у детей раннего возраста (5). Однако, из-за его относительно широкий запас прочности, смерть из-за передозировки диазепам редко. Значительное ухудшение психомоторных навыков в дозах 10-20 мг было продемонстрировано в исследовании, связанное с возможностью вождения, и это ухудшение в сочетании с сном индуцирующего эффектом препарата делает его возможный вклад в дорожно-транспортные происшествия импрор.

Там рассмотрено (6). Диазепам потенцирует угнетающее действие метадона, добавляя к проблемам управления наркомана. Злоупотребление диазепамом (40-80 мг в сутки), что приводит к серьезным абстинентным, сообщается в программах лечения наркотической зависимости (7). Эти опасности, связанные с неправильным использованием диазепамом причиной пищевых продуктов и медикаментов переквалифицировать его в качестве лекарственного средства Schedule IV.

Метаболизм и фармакокинетики

У человека, диазепам претерпевает два основных метаболических превращения: N-деметилирования и 3-гидроксилирование. В первом из этих маршрутов, диазепам метаболизируется в печени микросомальных ферментов N-desmethyl- диазепамом (II), который затем гидроксилированного с образованием Оксазепам (III). Диазепам гидроксилирования путь дает IV, который впоследствии деметилюют с III (3). Основной метаболит присутствует в крови

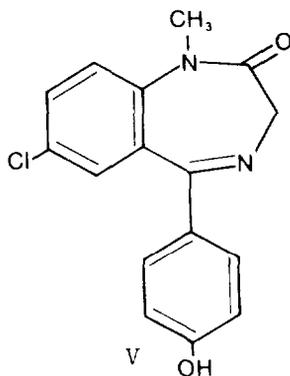
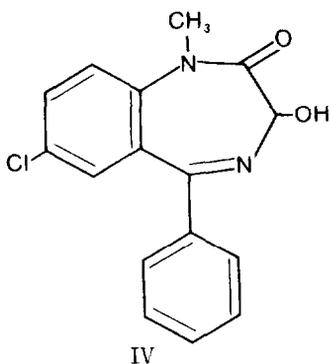
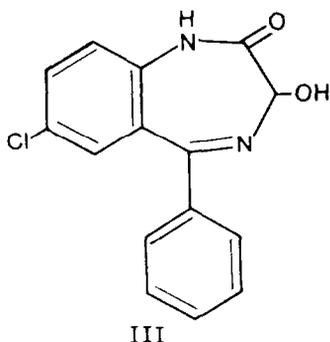
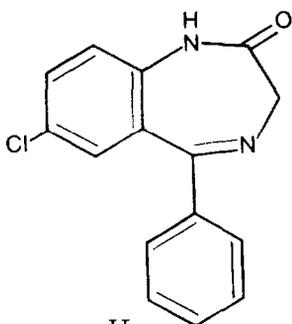
II, III, хотя и IV также найдены и при хроническом адми- страции II, будет равно или превышать концентрации в крови диазепамом. Вклад N-desmethyldiazepam (II), в клинических эффектов диазепамом человека не ясно (3,8), хотя фармакологические свойства метаболита, как правило, считается похож на своего предшественника; и противосудорожное действие, на самом деле, кажется, требует дезалкилирования (9). Оксазепам оказывает противосудорожную активность у мышей, сравнимых с N-desmethyldiazepam.

У человека, 60 к

75 процентов от дозы диазепамом перорально выводится с мочой. Наиболее распространенный метаболит в моче человека является Оксазепам-глюкурониды, но N-desmethyldiazepam, IV-глюкуронид и п-гидрокси-диазепам (V), также найдены (10). Неиспользованный диазепамом не сообщалось в более чем следовых количествах в моче (11).

Увеличение плазменной концентрации N-desmethyldiazepam относи- тернативы исходного лекарственного средства после неоднократных доз диазепамом предположило, что диазепамом может вызвать свой собственный метаболизм (12). Now- когда-либо, есть доказательства для альтернативного объяснения; т.е. ткань может быть насыщен метаболитом после первого прохождения через печень так, что повторные дозы приводят к повышению концентрации в плазме (13). N-desmethyldiazepam также был повторно перенесен в плазме крови человека в качестве метаболита chlorodiazepoxide (Librium) (14).

Диазепам сильно связан (> 97 процентов) с белками плазмы (15) и метаболизируется полностью, но медленно, в человеке, с терминала полувыведения, как правило, сообщается, находится в диапазоне от 20 до 50 ч, хотя оно может находиться в диапазоне до 90 часов в нормальные люди (1,8,16). Полувыведения зависит от возраста; то есть, до 5 раз дольше в Эль- derly лиц, чем у молодых людей (16). Полураспад обозначения methyldiazepam длиннее, около 50-100 ч (8,17), и это тоже составляет около 97 процентов белка переплета. Диазепам жирорастворимым, но лишь умеренно растворим в воде при физиологическом значении pH, так что мышечная интра- поглощение является медленным и неустойчивым, и пероральное или являются предпочтительными (15) внутривенный пути введения. Из-за своей большой период полураспада, диазепамом будет накапливаться в плазме. Например, при введении три раза в день, концентрация может возрасти в 3 раза более, что после однократного приема. Desmethyldiazepam накапливается по более медленно, как правило, появляются в плазме 24-36 часов после того, как



первая доза, и как исходный препарат и метаболит достигают стационарное состояние через 5-7 дней (18,19). Оба диазепы и N-desmethyl- диазепам могут присутствовать в фармакологически активных концентрациях через неделю после лечения остановлено (19). Тем не менее, значительные различия в фармакокинетических профилей наблюдаются между отдельными людьми, а не простая корреляция не существует между клинической реакцией и плазмы le- Велсе диазепам и N-desmethyldiazepam. Тем не менее, мини- мама стационарное состояние концентрации в плазме диазепам 400 нг / мл было сообщено, что необходимо для облегчения острой тревоги (20).

При хронической терапии у пациентов, получавших дозы 4-60 мг диазепам в день, концентрации в плазме крови представлены в диапазоне от 20-200 нг / мл диазепам и 32-2750 нг / мл N-desmethyldiazepam. В том же исследовании наблюдалось поглощение диазепам и его метаболита по ery- throcytes после 11 недель приема. Uncon-

jugated формы диазепама и его метаболитов в моче появились последователи мычание несколько недель лекарств (21).

После внутривенного введения 20 мг диазепама, в максимальной концентрации 1600 нг / мл было достигнуто в течение 15 мин, в то время как 20 мг принимают внутрь давали максимальную концентрацию в крови 490 нг / мл в течение 30 мин, а максимальный после внутримышечного введения было 290 нг / мл в 60 мин (22).

В других исследованиях, однако, пероральное админист-
трация 10 мг диазепама приводило к пик плазменной концентрации 100-200 нг / мл через 1,5 часа (23).
«Препарат метили тритием для этого исследования, а также снижение радиоактивности в плазме
показали быстрое и обширное поглощение тканями с последующим перераспределением в крови как
диазепам и N-desmethyl- диазепамом.

Скорость, с которой диазепам возвращается в центральный отсек от глубокого периферийного отсека было показано, что лимитирующей контролирующим фактором в ликвидации диазепама из организма и в формировании деалкилируют метаболитов; только 18 процентов от препарата в организме присутствует в центральном отсеке и доступны для ликвидации в любой момент времени (17). В пробирке вытеснения диазепов из человеческого сывороточного альбумина с помощью лауриновых кислот демонстрирова-, что связывающий белок, а также распределения в тканях, может пострадать от колебаний свободной плазмы жирных кислот (24). По- сколько желчи человека практически не содержит диазепам, N-desmethyldiaze-
утра, или их глюкуронид конъюгатов, как показано в исследовании с использованием

14 С-диазепам их длинные периоды полураспада в плазме не могут быть объяснены энтерогепатической циркуляции (10). Наличие заболевания печени, однако, было обнаружено, чтобы уменьшить связывание белка диазепама и продлить его ликвидации полураспада в плазме (16). Хронический прием пищи алкоголя. (25), а также потребление пищи (26), также может влиять на фармакокинетику внутривенного введения диазепама.

Начального свободного, несвязанного диазепама и N-desmethyldiazepam в цереброспинальной жидкости (CSF), как представляется, путем пассивной диффузии, быстро достигая концентрации, эквивалентные 2-4 процентов от общей концентрации в плазме (11). После долгосрочной терапии диазепов, однако, некоторое накопление метаболита в CSF по отношению к плазме было обнаружено, которые могут отражать высокие концентрации метаболита в ткани головного мозга в результате многократного введения диазепама (9). Desmethyldiazepam, как известно, накапливаются в головном мозге плода, сердца, печени, легких и тканей, когда мать приняла диазепам (27).

Концентрация диазепама в слюне была показана, что непо- пропорциональна концентрации несвязанного препарата в плазме (соотношение слюны / плазме 0,03). Это открытие имеет важное значение в том, что это повышает возможность получения образца неинвазивным методом для определения концентрации в плазме (28).

Обширный обзор клинической фармакокинетики диазепама и N-desmethyldiazepam было опубликовано (29).

АНАЛИТИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА

Количественный анализ спектрофотометрического ультрафиолетовое способны теа- концентрации Suring крови диазепам и N-desmethyldiazepam в результате дозах свыше 50 мг было сообщено в 1966 году. Количественное основан на измерении значений оптической плотности при 240 нм. Предел чувствительности 0,3 мкг / мл было достаточно для toxico- логических целей (18). Флуорометрического метод скрининга, способный обнаруживать бензодиазепинов в крови и моче в концентрации 25 нг / мл сообщалось недавно, но это не свиную диазепам и его метаболитов. Бензодиазепины присутствующие гидролизуют до бензофенонов, а затем превращают в 9 емых флуоресцентным-acridanones при нагревании с диоксидом свинца (30).

Для исследований метаболизма человека с использованием ¹⁴ C-меченого диазепам, тонкослойная хроматография (ТСХ) экстрактов, используя хлороформ: ацетон (9: 1) в качестве проявляющего растворителя, с последующим подсчетом импульсов из подхо- секций appropriate геля, был использован для измерения диазепам и его метаболитов в крови, моче и желчи (10). Недавно одна процедура ТСХ была разработана для применения в исследованиях биодоступности. Карбамазепин был добавлен в качестве внутреннего стандарта, чтобы buf- fered сыворотки (рН 8) перед экстракцией n-гексаном, содержащего 10 процентов изобутанола. Высушенный остаток растворяли в хлороформе и наносили на пластину ТСХ; проявляющий растворитель представлял собой этиловый двойка Tate: бензол: аммиак (35: 15: 0,15). После сушки пластины подвергали воздействию газообразного хлористого водорода в течение 30 мин, а затем к излучению при длине волны 254 нм. Диа zepam, N-desmethyldiazepam, и внутренний стандарт были Конверсия Теда флуоресцентных соединений с помощью этой процедуры, и флуоресценции была повышена путем погружения пластин в 10-процентном растворе парциаль- affin воска в легкой нефти. Количественный флуориметрии (например, 360 нм, et 460 нм), то можно было на основе калибровочных графиков, касающихся отношения высоты пика к концентрации лекарственного средства в диапазоне 50-500 нг / мл (31).

λ_{ξ}

λ_{ζ}

Дифференциальная полярография импульса на основе пики сокращения 4,5-азометин группы, а не специфичны для диазепам среди 1,4- бензодиазепинов, может измерить этот класс соединений в крови при чувствительности 250 нг / мл. Концентрация лекарственных средств и мета- bolites рассчитывается на основании результирующего тока подхо- appropriate внутренних стандартов. Разрешение отдельного benzodia- zepines может быть достигнуто путем введения стадии ТОЙ, что также повышает чувствительность до 50 нг / мл (32).

В настоящее время методы наиболее широко используемые для анализа бензо- диазепинов включают в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), иммунологические и газовой хроматографии с захватом электронов обна- ции (ГХ-ECD). ВЭЖХ имеет то преимущество, что она может быть использована для анализа чуждой для любого из бензодиазепинов и их основных метаболитов. Методы иммуноанализа (RIA, выделяющий) обеспечивают большую скорость и, когда большое количество образцов участвуют, более низкую стоимость, чем Хроматографические методы; однако, они имеют очень ограниченный динамический диапазон и являются более подходящими для качественного скрининга, чем количественное измерение. ГЙ-ECD обеспечивает превосходную чувствительность и специфичность, если используется колонок высокого качества, но является неудовлетворительным для

анализ некоторых бензодиазепинов и их метаболитов из-за их термической нестабильности. Более подробное обсуждение каждого из методов следует.

Количественный высокоэффективной жидкостной хроматографии на пористой силиконовой са, с использованием смеси н-гептан: изопропанол: метанол (40: 10: 1) с обнаружением с помощью УФ-поглощения при длине волны 232 нм, был разработан для обычных судебно-де-окончаний диазепам и N-desmethyldiazepam в человеческая кровь. Извлечение было сделано с бензолом с последующим обратной экстракцией в кислоту. При концентрации были выше, чем 100 нг / мл., 1 мл крови было достаточно для количественного определения с помощью ВЭЖХ, но и для более низких концентраций (25-100 нг / мл), 2 мл крови и повторение каждой стадии экстракции необходимо (33).

Колонку ВЭЖХ с обращенной фазой использовали для одновременного измерения диазепам и его фармакологически активных метаболитов, N-обозначении methyl diazepam и оксазепамом (34). Внутренний стандарт (хлор- diazepoxide) добавляли к 250 мкл сыворотки или плазмы вместе с натрий-фосфатного буфера (pH 11), и смесь экстрагируют хлороформом. Экстракт хроматографируют на колонке с μ -Bondapak CN (Waters Association, Milford, MA) с использованием системы растворителей ацетонитрил и фосфатного буфера (1: 2). УФ-детектирование при 254 нм давал линейный отклик от 20 до 2000 нг для каждого препарата и метаболита. День за днем точности, как сообщалось, 5 до 10 процентов. Два последних докладах также описывают ВЭЖХ с обращенной фазой для действия, чтобы подтвердить диазепам, которые были использованы для подтверждения измерений, полученные с помощью ГХ-ECD). Оба метода используют УФ-детектирование при 254 нм (35,36).

Электрохимический детектор работает в режиме восстановления служил в качестве детектора для ВЭЖХ-анализа для диазепов, нитразепов, и хлор- diazepoxide. Мобильная фаза метанол: вода (60:40), содержащую

0,05 M ацетата аммония (pH 7,25) использовали с колонкой с обращенной фазой. Помехи из-за уменьшение кислорода является одним из основных проб-лема, когда электрохимические детекторы работают в режиме восстановления. Попытки удалить кислород из растворителя и образца не удалось полностью устранить эти помехи. Тем не менее, диазепам, который может быть измерен при потенциале восстановительного -0.93 V, могут быть обнаружены в количествах, как низко как 3 нг (37).

Была разработана процедура радиоиммуноанализа (РИА) для диазепам в экстрактах крови после получения двух различных антител, один специфический для диазепам, а другое признание как диазепов и его метаболита, N-desmethyldiazepam. РИА был способен регистрирующая 1 нг препарата в высушенных эфирные экстракты цельной крови, и ответ был линейным до 100 нг (38). В отдельном РИА разработан специально для N-desmethyldiazepam, кросс реакции с диазепамом и большинство других бензодиазепинов было менее 1 процента пер-; этот анализ разрешено обнаружение всего лишь 3 нг / мл метаболита только в 10 мкл плазмы (39). Другой способ иммуноанализа, выделяющий, также сообщалось на бензодиазепин (40), но это не является специфическим для диазепам и используются только для мочи быть-причины вмешательства ферментов в плазме.

Газовая хроматография (ГХ) широко используется в анализе бензодиазепинов. Высокая полярность и низкая летучесть бензодиазепинов требуют использования термически стабильной жидкой фазы и хорошо дезактивированной упаковки колонки. Поскольку газовая хроматография этих соединений и, в частности N-desmethyldiazepam, это дифрактометре ficult, некоторые из более ранних методов GC, участвующих превращение бензодиазепинов в бензофенонов путем кислотного гидролиза до экс- тракцию и ГХ-анализ (41,42). Тем не менее, с недавними улучшениями в технологии ОИ колонки теперь можно хроматографировать как диазепы и N-desmethyldiazepam без предварительных химического транс- формации (таблица 1).

Газовая хроматография с детектором ионизации пламени (FID) не обеспечивает достаточную чувствительность для анализа концентрации в крови диа- зерат после терапевтической дозы. Тем не менее, из-за присутствия электроотрицательным заместителем хлора, диазепамом и его мета- bolites хорошо подходят для обнаружения захвата электронов (ECD) и многих анализов с использованием этого детектора были опубликованы (9,28,35,36, 43-50) ,

В общем, анализы ОИ-ECD способны измерить диазепы концентрации, как низкие, как приблизительно 10 нг / мл, хотя чувствительность 1 нг / мл были сообщены для анализа лекарственного средства в cerebrospinal- жидкости человека, когда **вз Детектор был использован Ni и griscofulvin был добавлен в качестве** внутреннего стандарта в экстракционном остатке непосредственно перед In- jection в chromatograph (9). Метод одинаково чувствителен (1 нг / мл) для анализа на N-desmethyldiazepam, подходит для фармако- кинетических исследований, использует N-десметили Тетразепы в качестве внутреннего стандарт- Дарда и опирается на экстракции из плазмы с помощью диэтилового эфира и кислот обратно экстракций для дополнительной очистки. Восстановление, по меньшей мере, 70 процентов сообщается. Сушат эфирный остаток дис- решается в гексан: ацетон (4: 1) и хроматографируют на колонке с кон- Taining 1 процент поли-A103 по газу Chrom Q с **вз Детектор Ni. Эта степень чувствительности требует скрупулезно чистой** стеклянной посуды, очень чистые реагенты, и тщательной экстракции / очистки про- цедуры (4 7). ECD анализы требуют больших затрат времени и, как правило, не- подходит для быстрого анализа большого числа клинических образцов; Таким образом, была разработана упрощенная процедура, в которой 2 мл Na₃ ПО₄ насыщенный дистиллированной воды добавляли к 1 мл цельной крови для осаждения белков (конечный pH = 12,8). После тщательного перемешивания вихря, образец экстрагируют бензолом: метилхлорид (9: 1). Экстракт упаривают досуха, растворяют в 100 мкл бензол: ацетон: метанол (80:15:10) и анализируют с помощью ГХ-ECD с- дальнейшую очистку. Чувствительность, зарегистрированная на этом бом была 5 нг / мл крови (43).

В другой адаптации GC-ECD для быстрых (<1 часа) количественного диазепам в 1-мл образцов крови человека, метил клоназепам был добавлен в сыворотку или плазму в качестве внутреннего стандарта перед экстрак- ции с толуолом при pH 9, обратно экстракции в кислоту, и геextrас- ции с толуолом. Непроизводного диазепам и N-desmethyldiazepam были проанализированы на 3 процента OV-17 колонке, **снабженной вз Ni-ECD (44) Точно так же, чувствительность 5 нг диазепам и 10 нг N-дез- methyldiazepam на** мл плазмы была зарегистрирована для автоматизированного

Таблица 1. газохроматографическая АНАЛИЗЫ ДЛЯ ДИАЗЕПАМА
И / ОК N-DESMETHYLDIAZEPAM

<u>Экстракция растворителем</u>	<u>GC Колум N</u>	<u>внутренний Standar d</u>	<u>детектор</u>	<u>Справка</u>
Толуол: гептан (4: 1)	2% OB-17	Griseofulvin	ECD	9
Диэтиловый эфир плюс обратной экстракции	1% поли-A103	Desmethyl- Тетразепам	ECD	47
Бензол: хлористый метилен (9: 1)	3% OB-17		ECD	43
Толуол и обратно экстракция	3% OB-17	метил- клоназепам	ECD	44
Бензол	3% OB-17	Метил нитрозепам	ECD	45,48
Толуол: гептан (4: 1) плюс 1,6% изоамиловый спирт	3% OB-17	мезапы	ECD	46
Толуол: гептан: изоамиловый спирт (76: 20: 4) гексан: этилацетат (7: 3)	3% OB-17	Флунитразепам	ECD	35
	3% SP2250-БД	празепам	ECD	36
Толуол	3% OB-17	Flurazepam	ECD	28
Толуол: гептан (9: 1)	3% OB-17	празепам	ECD	49
Диэтиловый эфир плюс обратной экстракции	3% OB-17	празепам	NPD	51
Бензол: изоамиловый спирт	3% OB-17	Ro 7-9957 и Ro 7-9749	ECD	50
- -	3% OB-17	Северная Каролина 2 ЧАС 7- диазепам	МИЗ	52
Этилацетат		Северная Каролина 2 ЧАС 7- диазепам	МИЗ	53

Экстракция растворителем	GC Колум N	внутренний стандарт	детектор	Справка
Диэтиловый эфир плюс обратной экстракции	1% OB-17	мезапам	FID	54
хлористый бутил	2% OB-17	празепам	FID	55

Анализ ГХ-ECD с использованием бензола для экстракции и methylnitrazepam в качестве внутреннего стандарта (45). Когда метод экстракции одношагового был объединен с ГМ с использованием частотно-отклик ECD, линейная чувствительности в диапазоне 10- 500 нг / мл сыворотки были достигнуты (46). Метод разрешается результаты до 40 клинических образцов, сообщили в тот же день.

Еще одна быстрая процедура экстракции была применена для одновременного количественного определения четырех бензодиазепинов в крови и плазме. Один мл насыщенного буфера бората добавляют от 0,05 до 1,0 мл жидкости тела и полученную смесь экстрагировали 1 мл системе растворителей, включающей толуол: гептан: изоамиловый спирт (76: 20: 4). После центрифугирования,

1,5 мкл органической фазы удаляют и вводят непосредственно в GG-ECD. Метод дал адекватную чувствительность для измерения терапевтических уровней бензодиазепиновых лекарственных препаратов и их метаболитов (35).

N-Desmethyldiazepam было измерено в плазме с помощью ОГО-ECD после введения дикалиевого клоразепата, препарата, который подвергается спонтанному декарбоксилированию с N-desmethyldiazepam при pH <4 (48). Был использован быстрый и удобный процесс экстракции, состоящий из добавлением 0,1 мл насыщенного раствора хлорида калия в 0,1 мл плазмы и экстрагируют 1 мл бензола, содержащих 25 нг methylnitrazepam в качестве внутреннего стандарта.

Различные методы были зарегистрированы для улучшения хроматографического ФКМСА характеристики бензодиазепин, и в частности, N- desmethyldiazepam. Необходимость грунтовки колонки ОИ перед тем быть анализ каждой очистки хлопка дневного часто упоминаются. Грунтовочные агенты, которые оказались полезными, включают: 1) заготовки плазмы экстрактов (35,50,59), 2) лецитина в этаноле (5 г / л) (49), и 3) холестерина в ацетоне (49). Было обнаружено, что новая жидкая фаза (SP-2250 БД, Су- Pelco, Inc.), чтобы значительно снизить GC пик хвостохранилища N-desmethyldiazepam по сравнению с OB-17 или OV-1 столбцов (36).

Поскольку свободный N-водород в N-desmethyldiazepam может водородная связь с активными центрами в колонке GC, преобразование метаболита в N-алкильном производный, может привести к значительно улучшенной хроматографической поведением. N-бутил-производного была сформирована экстрактов- ки в растворе диметилацетамида извлеченного остатка с помощью гидроксида тетрабутиламмоний и 1-иодбутаном (49). Процедура ушной N-buty- дал более надежные результаты, чем формирование

производное триметилсилил (54). Подобная дериватизацию увлеченности Инг образования производного N-пропил-н-desmethyldiazepam объединяли с использованием детектора азотно-фосфорного для квантованности titation диазепама и его основного метаболита в цельной крови (51).

Несмотря на то, FID не столь чувствителен как ECD, она менее легко загрязняется и из-за его широкий диапазон линейности часто предпочтительно для повседневного использования в патологии и токсикология трудоемкого аторий. Включение задних процедур экстракции и вну- тренних стандартов позволяет диазепа, подлежащий измерению в сыворотке концентраций, как низко как 80 нг / мл (54). Однако, так как многие нейтральные и основные лекарства могут присутствовать в конечном экстракте, подтверждение идентичности с помощью ТСХ желательно (55).

Использование масс-спектрометрии, как системы детектора для GC отстоящей товки наркотиков в биологических жидкостях указываются, когда препараты присутствуют в пикограмме на низкие **напограммы на интервал мл. Северная Каролина 2 ЧАС 3** Диазепам использовали в качестве внутреннего стандарта в двух исследованиях с со- роо количественному диазепам в плазме (52) и в грудном молоке (53) с помощью ГХ / МС.

Оба диазепа и N-desmethyldiazepam легко извлекаются из биологических сред с помощью различных органических растворителей. Экстракции обычно делается при щелочном pH. Назад экстракции в кислоту используют с целью достижения дополнительной очистки пробы. Тем не менее, некоторые соли препарата и его метаболитов трудно извлечь из растворителей, таких как хлороформ и метилхлорид.

Диэтиловый эфир обычно используется для экстракции диазепама и N-desmethyldiazepam из крови, мочи, желчи или (16,18,38,54,56); при pH 7 эффективность восстановления составляет 90 процентов. Другие растворители повторно портирована для экстракции диазепама включают бензол (> 90 процентов из крови, мочи, гидролизатов или тканевых гомогенатах) (10,26,43,45,50); бензол: метилхлорид (9: 1, > 85 процентов из крови) (3,32,43); этил-бензоат (56); хлороформ (90 процентов) (58,59); гексан: изо- амиловый спирт (98,3: 1,7) из крови или желудочной жидкости (30); 1-хлориды gubutane затем хлороформ после обратной экстракции в кислоту (100 процентов от крови или ткани гомогенат) (55); и толуол: гептан: изоамиловый спирт (78: 20: 2, 96 процентов при pH 9,5 из крови, гомогенатах, и мочи) (21,35); или толуол, содержащий 1.

Выбор растворителя и pH зависит частично от метаболитов, подлежащего измерению. Например, гидроксильные метаболиты обладают свойствами дифрактометра ferent перегородки из диазепама, и Оксазепам теряются при pH больше, чем 10 (21). Поскольку диазепам метаболитов происходит в основном в виде водорастворимых конъюгатов в моче, Amberlite XAD-2 смола была рекомендована для извлечения этих соединений из мочи подщелачивают до pH 8-9. Поглощенные соединения элюируют смесью этилацетат: метанол: уксусная кислота (90: 10: 0,1). Элюат выпаривают и остаток растворяют в буфере и гидролизуют с помощью бета-глюкуронидазы / арилсульфатазу перед экстракцией этилацетатом. Восстановление 95 процентов было сообщено для этого бого (60).

Диазепам удивительно стабилен; не было обнаружено никакой потери концентрации происходит в образцах плазмы, хранившихся в течение 1 года при температуре 20 °С, через 8 недель при 4 °С или 20 дней при комнатной температуре (61).

Обширные обзоры анализа диазепама и других benzodi- азепиновых в биологических образцах были опубликованы (4, 1,62).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОЦЕДУРА

Концентрации в крови активного метаболита, N-desmethyldiazepam, часто являются сопоставимыми или больше, чем у исходного лекарственного средства. Поэтому важно, чтобы измерить концентрации обоих соединений. Следующая процедура включает добавление дейтона ованные аналогов диазепама и его основной метаболит к телу жидкости образца для использования в качестве внутренних стандартов и простой прямой extras- ции в небольшом volume органического растворителя с последующей инъекцией аликвоты органического экстракта в ГХ / МС. Соотношение концентраций лекарственного средства и метаболит к их дейтерированным аналогам измеряют с помощью выбранного иона мониторинга при использовании химической ионизации метана и аммиака в качестве газообразных реагентов. Поскольку метод включает в себя только одну экстракцию, ни концентрации экстракта, и нет дериватизации, это очень быстро;

Стандарты и реагенты

Диазепам, используемый в разработке этого метода был приобретен у Applied Science Laboratories, State College, PA 16801. N-desmethyldiazepam получали в дар от Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, NJ 07110. The pentadeuterated аналоги диазепамом и N-desmethyldiazepam были синтезированы исходя из bromobenzene-2 ЧАС₅ по опубликованным методикам (63). Оп основа ОГО / МС аны лизиса, как дейтерированные аналоги были более чем на 99 процентов чистыми и имели следующий изотопный состав: 2 ЧАС₅, 96,0 процента; 2 ЧАС₄,

3,4 процента; 2 ЧАС₃, 0,4 процента; а также 2 ЧАС₂, 2 ЧАС₁ а также 2 ЧАС₀ < 0,2 процента. Все атомы дейтерия были расположены на фенильном кольце каждой структуры. Неисправленная точки плавления для **дейтерированных соединений были: diazepam-2 ЧАС₅, 131-132 °С; N-desmethyldiazepam-2 ЧАС₅,**

215-216 °С.

Подготовка буфера pH 9,6 путем растворения 500 г калия моно- гидрофосфат (K₂ HPO₄) примерно в 500 мл дистиллированной воды. Дайте раствору остыть до комнатной температуры, а затем добавить достаточное количество дистиллированную воду, чтобы сделать ровно один литр.

С целью подготовки графиков калибровки и рабочих стандартов исходных растворов диазепама и N-desmethyldiazepam получают следующим образом. Взвешивание в 100-мл мерную колбу около 10 мг диазепама и 10 мг N-desmethyldiazepam, и записать весов с точностью до 0,1 мг. Растворите измеренное лекарственное средство и метаболит примерно 75 мл метанола, а затем добавить дополнительный метанол до ровно 100 мл раствора. Это решение будет именоваться как «0,10 мг / мл исходного раствора», хотя это должно быть маркировано

с фактической концентрацией основывается на точной измеренных весов диазепама и N-desmethyldiazepam. Серия рабочих стандартных растворов затем могут быть получены путем соответствующего разбавления исходного раствора, как описано в главе 2.

Исходный раствор diazepam-2 ЧАС₅ и N-desmethyldiazepam-2 ЧАС₅ получают таким же образом. Для измерения лекарственного средства и мета- bolite в жидкостях организма в диапазоне концентраций 5 до 1000 нг / мл, добавление приблизительно 40 нг внутренних стандартов каждого мл образца является удовлетворительным. Это может быть удобно сделать путем добавления 100 мкл метанольного раствора, содержащего 400 нг / мл как diazepam₂ ЧАС₅ и N-desmethyldiazepam-2 ЧАС₅ на каждый мл образца. Подготовьте / мл раствора внутреннего стандарта 400 нг на ди- герметизирующих 1 мл 0,10 мг / мл исходного раствора diazepam-2 ЧАС₅ и N-desmethyldiazepam-2 ЧАС₅ до 250 мл метанола.

Хранить запас и работы стандартных решений в хорошо закупоренных или заблокированных стеклянных сосудов в темноте при температуре ниже 0 ° C.

Процедура экстрагирования

Передача 1 мл жидкости тела (цельная кровь, плазма или моча) до 5 мл с притертой пробкой, коническая центрифужной пробирки. Добавьте 100 мкл раствора внутреннего стандарта, содержащего 400 нг / мл diazepam-2 ЧАС₅ и N-desmethyldiazepam-2 ЧАС₅ и **вихрь смеси в течение 10 сек. Аль- низкого образец для уравнивания в течение 15 мин и затем добавляют 1 мл К₂ НРО₄ буфер (pH 9,6), а затем 100 мкл растворителя, состоящего из толуола: гептан: изоамилового спирта в объемном соотношении 70:20:10. Закрывают пробирку и вихревой смеси в течение по меньшей мере 30 сек. Фазы разделяют центрифугированием в течение 10 мин. Органический растворитель будет образован узкий верхний слой, из которого аликвоту может быть удалена с помощью шприца для инъекций в ГХ / МС, если не существует четкое разделение слоев и четкий верхний слой растворителя повторяют центрифугирование при более высоком скорость (2000 XG).**

≥

ГХ / МС анализ

Экспериментальные условия для одновременного анализа ГХ / МС диазепама и N-desmethyldiazepam заключаются в следующем:

ГХ колонка:	1 м x 2 мм колонка (ID), стекла упакованы с 3 процентами OV-17 на 20М Ультра-связи, 100/120 меш (RFR Corp., Надежда, RI, 02831) метана, 15-20 мл / мин
Газ-носитель:	
Реагент газ:	Аммиак, вводится в ионную камеру, как описано в главе 2
Температуры	Инжектор, 290 ° C Колонка, 270 ° C изотермического ГХ / МС переноса линия, 280 ° C Источник ионов, 160 ° C

В этих условиях диазепам должен элюироваться на 1 до 2 мин и N-desmethyldiazepam на от 2 до 4 мин.

До начала ГХ / МС анализ образцов, производительность общей системы ГХ / МС должна быть оценена и оптимизирована, как описано в главе 2. Ионы, которые будут происходить при отслеживаемые м / г 285,

290, 271 и 276. Они соответствуют протонированной молекуле ионов для диазепама, диазепама z ЧАС s, N-desmethyldiazepam, и N-desmethyl- diazepam- z ЧАС s, соответственно. С отбракованных клапана в положении отбракованных, вводят от 4 до 10 мкл экстракта органического слоя в ГХ / МС. Примерно через 1 мин переключить отбракованный клапан таким образом, что весь поток газа-носителя поступает в источнике ионов масс-спектрометра и начинает сбор данных. Для достижения максимальной чувствительности монитора только диазепам массы ионов (m/z 285 и 290) до тех пор, пока diazepam элюируется из колонки ГХ, а затем отслеживать N-desmethyl- diazepam массы ионов (m/z 271 и 276) до тех пор, он вымывается. Если система данных ГХ / МС не допускает быстрые изменения в контролируемых ионных масс, все четыре иона массы должны быть проверены в течение периода элюции для лекарственного средства и его метаболита. Как правило, последняя процедура приведет лишь небольшую жертву чувствительности. Когда N-desmethyldiazepam имеет элюировали, прекратить сбор данных и вернуть отбракованный клапан в положение отбракованного. Величины диазепама и N-desmethyldiazepam в жидкости тела определяет путем измерения высот пиков (или зоны) препарата, в метаболизируемом лайте и внутренних стандарты в выбранном ионном токе про- файлов, и соотношения соотношений высот пиков для калибровки графиков (глава 2). Расчет концентрации жидкости тела диазепама и N-desmethyldiazepam путем деления измеренных количеств этих соединений путем точного объема образца, экстрагированных, метаболизируемые облегченные и внутренние стандарты в выбранном ионном токе про- файлов, и соотношение соотношений высот пиков для калибровки графиков (Глава 2). Расчет концентрации жидкости тела диазепама и N-desmethyldiazepam путем деления измеренных количеств этих соединений путем точного объема образца, экстрагированных, метаболизируемые облегченные и внутренние стандарты в выбранном ионном токе про- файлов, и соотношение соотношений высот пиков для калибровки графиков (Глава 2). Расчет концентрации жидкости тела диазепама и N-desmethyldiazepam путем деления измеренных количеств этих соединений путем точного объема образца, экстрагированных.

Обсуждение процедуры экспериментальной

Диазепам и некоторых других бензодиазепинов и их метаболизируемые Lites чаще всего анализируют с помощью ГХ-ECD, который может обеспечить очень высокую чувствительность и специфичность. Метод ГХ / МС, описанный здесь, способен сопоставимой чувствительности и специфичности даже лучше, чем методы ГХ-ECD. На рисунках 1 и 2 сравнивают CI метана и масс-спектры ДИ метан-аммония диазепама и N-desmethyl- диазепамом. Все спектры преобладают обильные прото молекулы пиков за NAT ионов. Для этих двух соединений либо газа-реагента могут быть использованы и должны обеспечивать подобную чувствительность, но метан-аммиак сочетание газа-реагента будет приводить к более последовательных ионизации. Высокая селективность является необходимой, поскольку в насадном, прямых результатах процедуры экстракции в относительно «грязного» экстракта.

Дополнительная специфичность может быть предоставлена также о мониторинге 37 Пики CI- изотопные (m/z 287, 292, 273, и 278) для каждого из ионов молекул протонно ованные. Высоты пика 37 Пик ДИ-изотоп должен быть точно на одну треть интенсивность соответствующего 35 CI- пика изотопа высоты для каждого соединения. Любое отклонение от соотношения одной трети указывает, мешающий соединение contribu- тин к ионному току на одном из контролируемых масс. Как правило, визуальное изучение ионного тока профилей раскрывает

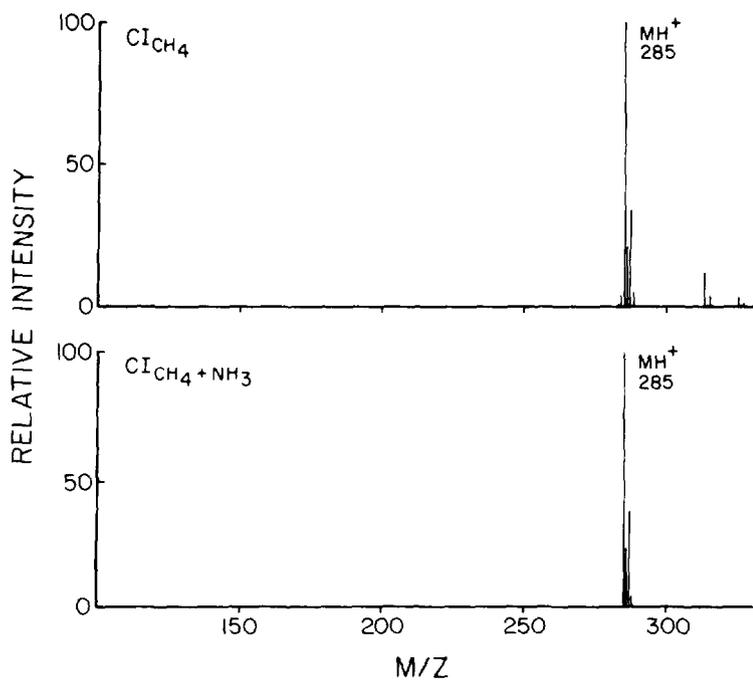


Рисунок 1. химической ионизацией масс-спектры ДИАЗЕПАМА

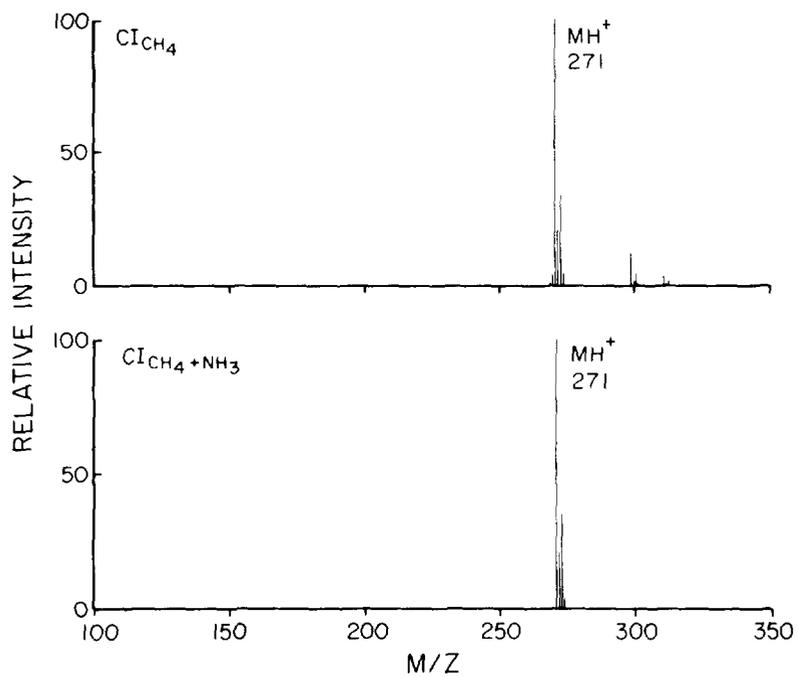


Рисунок 2. химической ионизацией масс-спектры N-дез-
METHYLDIAZEPAM

какой из высот пиков является неточным из-за помехи; т.е. пик будет иметь плечо, или будет заметно уширен, или будет иметь ненормальное время удерживания.

Если еще больше чувствительности необходима, отрицательный ион химических ионных зации могут быть использованы. Диазепам и N-desmethyldiazepam обладают высоким сродством к электрону и, следовательно, эффективно ионизируются электронным захватом при метане условий химической ионизации. В неопубликованная работа проводится в Battelle Columbus Laboratories, вплоть до 30-кратное улучшение чувствительности было достигнуто за счет перехода от положительного обнаружения ионов к отрицательным обнаружения ионов в то время орег-ляющего масс-спектрометр при обычных услови-ных Cl метана. К сожалению, существует значительные проблемы, связанные с количественными измерениями, полученных с помощью электронного захвата ионов пренебрежимо ческой химической ионизации. Одна из трудностей, показаны на рисунке 3, который сравнивает отрицательный масс-спектры ионов Cl диа-зерат приобретенного при температурах ионного источника 80 ° и 170 ° C. В спектре приобретенного при более низкой температуре источника ионов в мольный анион в лярном м / з 284 является единственным заметным пиком, наблюдаемым, и анион хлорида при т / г 35 имеет относительную интенсивность лишь на 10 процентов. При температуре источника ионов 170 ° C диссоциативный процесс захвата электронов доминирует так, что хлорид-анион приходит Б наиболее интенсивный пик в спектре, в то время как пик молекулярного аниона практически исчез (около 2 процентов относительной интен-) В городе. Следовательно, для того, чтобы использовать электронно-захвата отрицательных ионов химической ионизации для количественного измерения диазепам с высокой чувствительностью, необходимо поддерживать низкую температуру ионного источника (<100 ° C), даже при том, что источник ионов имеет тенденцию загрязняться более быстро при низкие температуры. Большая тем-пературы эффект опытный с отрицательными химической ионизацией ионов также может привести к плохой воспроизводимости в количественных измерениях, хотя применение дейтерированных аналогов в качестве внутренних стандартов крупно- юта компенсирует изменения в процессе ионизации. Выбор хроматографической колонки имеет решающее значение в ГХ / МС анализиса диазепам и N-desmethyldiazepam, особенно при низких нанogramмовые-величины вводили в колонку. Ультра-связь колонки 20M упаковка поставляется в RFR Corporation является очень не- активная поверхность, хорошо подходит для газовой хроматографии полярных препаратов и метаболитов. Оба диазепам и N-desmethyldiazepam дают Нар строку, относительно симметричные пики при хроматографии в условиях, указанных здесь.

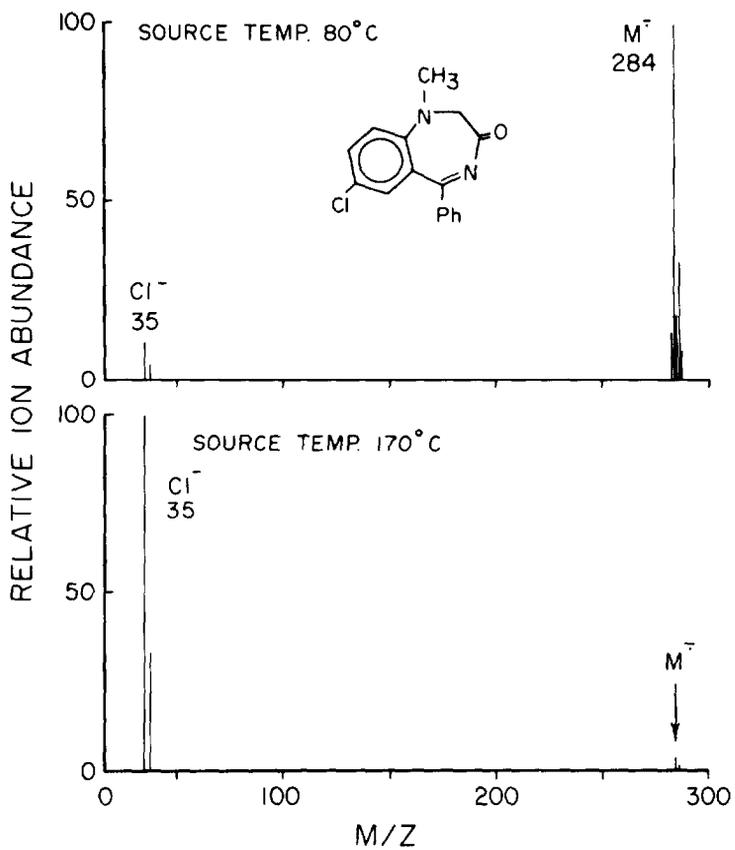


Рисунок 3. Отрицательный ион МЕТАН ДИ Масс-спектры
 DIAZEPAM RECORDED НА РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ ТЕМПЕРАТУРА ION

Физические, химические и СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ДАННЫЕ ДЛЯ ДИАЗЕПАМА

Номенклатура

Химическое название: 7-хлор-1,3-дигидро-1-метил-5-фенил-2Н-1,4-Бен
zodiazepin-2-он

Эмпирическая формула: C₁₆ H₁₃ Cl N₂ O

Номер Chemical Abstracts реестра: _____ 439-14-5

Торговые названия: Ansiolin, Apavrin, Aprozepam, Atensine, Atilen, Bial-
zepam, Calmpose, Ceregular, Dipam, Эридан, Faustan, Lembrol, Levium, Morosan,
Noan, Pacitran, Paxate, Paxel, реланиум, Седуксен, Setonil, Stesolid, Steso- линь,
Tranimul, глицерол, Vival, Vivol

Физические константы

Физическое состояние: Off-белого до желтого кристаллического порошка

Точка плавления: 125-126 ° C

Удельное вращение: оптический неактивное

pKa: 3,4

Растворимость: при комнатной температуре 1 г диазепама будет растворяться в
20 л воды, 56 мл диэтилового эфира, 20 мл мет- Анол, 4,5 мл бензола, и менее 2 мл
хлор- формы.

УФ-поглощение: _____ $\lambda_{\text{Максимум}}$ на 242, 285 и 368 нм (в 2 н HCl)

Физические, химические и СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ДАННЫЕ ДЛЯ N-DESMETHYLDIAZEPAM

Номенклатура

Химическое название: 7-хлор-1,3-дигидро-5-фенил-2Н-1,4-benzodiaze-
пин-2-он

Эмпирическая формула: C₁₅ H₁₁ Cl N₂ O

Номер Chemical Abstracts реестра: _____ 1088-11-5

Физические константы

Физическое состояние: Off-белого до желтого кристаллического порошка

Точка плавления: 216-217 ° C

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. DJ Гринблатт и Ричард I. Shader. *New England J. Med.*, 291, 1011 (1974).
2. А. Макдональд, А. Ф. Михаэлис и BZ Senkowski в К. Флори, изд. Аналитические профили лекарственных субстанций, Vol. 1. Academic Press, Нью-Йорк, стр. 79 (1972).
3. М. М. Reidenberg, М. Леви, Х. Уорнер, СВ-Кутиныю, М.А. Шварц, Г. Ю., и Дж Cheripko. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 23, 371 (1978).
4. JJ Tanja, CR Clark и DE Griffies. *J. Anal. Toxicol.*, 1, 175 (1977).
5. И. Саксен и Л. Саксен. *Ланцет*, 2 (7933), 498 (1975).
6. JFW Хэффнер, Дж Морланда, Дж Setekleiv, CE Stromsaether, A. Danielsen, PT Frivik и Ф. Dybing. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 32, 161 (1973).
7. J. Wiersum. *J. Amer. Med. Доц.*, 227, 79 (1974).
8. Л. Хиллестад, Т. Хансен и Х. Melsom. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 16, 485 (1974).
9. J. Гендель. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 37, 17 (1975).
10. WA Махон, Т. Инаба, Т. Умэда, Е. Цуцуми, и Р. Стоун. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 19, 443 (1976).
11. J. Канто, Л. Kangas, и Т. Siirtola. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 36, 328 (1975).
12. P. Sellman, Дж Xanto, Е. Rajjola, и А, Pekkarinen. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 37, 34,5 (1975).
13. К. Korttila, МДж Mattila, и М. Linnoila. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 36, 190 (1975).
14. Р. Диксон, М. А. Брукс, Е. Postma, М. Р. Хэкмен, С. Спектор, JD Мур, М. А. Шварц. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 20, 450 (1976).
15. У. Klotz, КН Антонин, П. Biesck. *Архипелаг Pharmacol.*, 287, Suppl, R90 (1975).
16. У. Klotz, Г. Р. Авант, А. Ноуумра, С. Шенкер и ГР виль- Kinson. *J. Clin. Инвойс* , 55, 347 (1975).
17. SA Каплан, М. Л. Джек, К. А. и Р. Weinfeld. *J. Pharm. Sci.*, 62, 1789 (1973).

18. JAF де Сильва, Б. А. Koechlin и Г. Бадер. *J. Pharm. Sci.*, _____
55, 692 (1966).
19. Э. ван дер Kleijп, PJM Guelen, CGWM ван Вейк, И. Баарс и Ври ТБ, в Г. Леви, изд. клинической
Pharmokine- тики.: Симпозиум. Amer. Pharm. Assoc., Изд. Pharmaceutical Sciences (октябрь
1974), стр. 79. _____
20. Н. Dasberg. *Psychother. Psychosom.*, 24, 113 (1974). _____
21. IA Zingales. *J. Chromatogr.*, 75, 55 (1973). _____
22. Л. Хиллестад, Т. Хансен, Х. Melsom, и А. Drivenes. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 16, 479 (1974). _____
23. М. Шварц, Б. А. Koechlin, Е. Postma, С. Палмер и Г. Кроль. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 149, 423
(1965). _____
24. Е. Цуцуми., Т. Инаба, Вашингтон Махон и W. Kalow. *Biochem. Pharmacol.*, 24, один тысяча триста
шестьдесят одна (1975). _____
25. P. Sellman, Дж Канто, Е. Rajjola, и А. Пеккаринен. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 36, 33 (1975). _____
26. M. Linnoila, K. Korttila и МДж Маттила. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 36, 181 (1975). _____
27. М. Манделли, П. Л. Морселли, С. NORDIO, Г. Парди, Н. Principi,
Ф. Sereni и Г. Tognoni. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 17, 564 (1975). _____
28. ГДж DiGregorio, АJ Пирайно, и Е. Рух. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 24, 720 (1978). _____
29. М. Манделли, Г. Tognoni и С. Garattini. *Clin. Фарма cokinetics*, 3, 72 (1978). _____
30. JC Valentour, JR Monforte, Б. Лоренцо, и я Саншайн. *Clin. Chem.*, 21, 1976 (1975).

31. PJ Ван дер Мерве и JM Стейн. *J. Chromatogr.*, 148, 549 (1978). _____
32. М. А. Брукс, Л. D'Arconte, М. Р. Хэзмэн и JAFde Сильва.
J. Anal. Toxicol., 1, 179 (1977). _____
33. А. Буг. *J. Chromatogr.*, 128, 111 (1976). _____
34. JJ MacKichan, WJ Юшко, PK Duffner и ME Коэн. *Clin. Chem.*, 25, 856 (1979).

35. М. А. Торф и Л. Коржак. *Дж судебной Sci.*, 24, 46 (1979). _____
36. JE Уоллес, HA Schwertner и EL Shimek, Jr. *Clin. Chem.* _____
25, 1296 (1979).

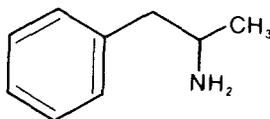
37. В. Лунд, М. Hannisdal и Т. Greibrokk. J. Chromatogr., 173, 249 (1979).
38. Б. Peskar и С. Спектор. J. Pharmacol. Exp. Ther., 186, 167 (1973).
39. Р. Диксона, В. Гловер, Дж Эрли, и М. Делани. J. Pharm. Sci., 68 1471 (1979).
40. ВН Хейден, К. Макнейл, Н. А. Huber, WA Хан, Р. Singh, и RS Schneider. Clin. Chem., 22, 1200 (1976).
41. DM Хейли. J. Chromatogr., 98, 527 (1974).
42. АК Dhaг и Н. Кутта. Clin. Chem., 25, 137 (1979).
43. JAF де Сильва, И. Bekersky, CV Puglisi, М. А. Брукс, и RE Weinfeld. Анальный. Chem., 48, 10 (1976).
44. JL Фергюсон и Д. Couri. J. Anal. Toxicol., 1, 171 (1977).
45. RE Weinfeld, HN Posmanter, KC Khoo и CV Puglisi. J. Chromatogr., 143, 581 (1977).
46. М. Linnoila и Ф. Dorrity, младший Acta Pharmacol. Toxicol., 41, 458 (1977).
47. A. Viala, Ж.-П. Кано, Ж.-П. Ренье, Р. Rispe. J. хромо matogr., 147, 349 (1978).
48. Д. Haidukewych, Е. А. Родин, Р. Davenport. Clin. Chem. 26, 142 (1980).
49. JJ De Gier и ВJ «т Харт. J. Chromatogr., 163, 304 (1979).
50. DJ Гринблатт. Clin. Chem., 24 1838 (1978).
51. НН McCurdy, EL Slightom и JC Harrill. J. Anal. Тохі- цв., 3, 195 (1979).
52. ВМ Yehia, JS Оливер и А. Маккей. Ветеринарный Hum. Toxicol., 21 (Suppl.), 167 (1979).
53. М. Хорнинг, РГ Стиллиуэлл, Дж Наулин, К. Lertratanangkoon, Д. Кэрролл, И. Dzidic, Р. Stillwell и ЕС Horning. J. Chromatogr., 91, 413 (1974).
54. МС Гривз. Clin. Chem., 20, 141 (1974).
55. RC BASELT, СВ Стюарт и SJ Franch. J. Anal. Toxicol., 1, 10 (1977).
56. JF Стейн и НKL Hundt. J. Chromatogr., 107, 196 (1975).

57. А. Говард, Г. Nickless и Д. Хейли. J. Chromatogr., _____
90, 325 (1974).
58. Г. Vanelli и П. Marini. Болл. Хим. Unione Ital. Лаборатория Прит., _____
2, 310 (1976).
59. Л. Б. Фостер и СS Фрингс. Clin. Chem., 16, 177 (1970). _____
60. Х. Sawada, А. Хара, С. Асано, и Y. Matsuaoto. Clin. Chem. _____
22, 1596 (1976).
61. PJ Говард. J. Pharm. Pharmacol., 30, 136 (1978). _____
62. ВJ Gudzinowicz и МДж Gudzinowicz, анализ средств и Метаболиты методом газовой _____
хроматографии-масс-спектрометрии, Vol. 2: снотворные, противосудорожные и седативные _____
средства. Marcel Dekker, New York, гл. 2, VII (1977).
63. А. Ф. Фентимэн, младший и RL Фольц. J. меченых соединений и радиофармпрепаратов, 13, 579 _____
(1977). _____

амфетамин

В течение многих веков ката растение культурируется на Ближнем Востоке для его центральной нервной системы (ЦНС), стимулирующего свойства. Синтетический родственник ката алкалоидов, амфетамин (-метил-фенилэтиламин, I), впервые был выпущен в 1887 году, но его psychopharmacological свойства не были описаны до 1927 (1). В течение следующих 30 лет, медицинское применение амфетамина (как бронхолитическое, как для подавления аппетита, при лечении гиперкинезов в детей месте Примите и нарколепсии) была обширна (2), а 1967 потен TiAl для злоупотреблений препарат вызывает всеобщее беспокойство. Регулярное использование орального амфетамина может вызвать параноидальный психоз и ОТСОЕДИНЯТЬ аблнг зависимость и внутривенное использование еще более вероятно, приведут к этим эффектам. В первую очередь из-за первоначальную эйфорию, еспеси- союзника после внутривенной инъекции, амфетамин стал ма-Джор наркотиком. подавление аппетита, бессонница, резкие перепады настроения, и навязчивости являются общими результатами даже модулирование использования Черенков амфетамин. Толерантность развивается быстро, так что возрастающие дозы Ing необходимы для достижения желаемой стимуляции (3).

Амфетамин продаются для медицинских целей, как Dexedrine (d-амфетамин) и, как Benzedrine (D, L-амфетамин), или в комбинации с



I

барбитурат (например, Dexatyl, d-амфетамин + амобарбитал) (4). Now- когда-либо, из-за относительной простоты изготовления, незаконной готовит в амфетамина предпосылок к возникновению обычны в использовании «улицы». В результате кон- taminants часто присутствуют. Значительные количества цинка (1-2 процента) были обнаружены в некоторых незаконных образцов, а также поли продукты конденсации которых фармакологические и токсикологические про- perties неизвестны (5), хотя существуют доказательства того, что плотность интен- эйфории следующие внутривенная инъекция может зависеть от кон- taminants (3). Тяжелые реакции могут возникать в nontolerant лиц после введения дозы 30 мг амфетамина, в то время как лица, которые развили толерантность могут переносить дозы 400-500 мг. В то время как истинная физическая зависимость не была доказана, очень сильное психологическое привыкания амфетамина является распространенным явлением. В своей крайней форме,

на 6-13 процентов от дозы по сравнению с 3-8 процентов в кислой моче (17).

В исследовании с использованием крыс в качестве моделей, ингибирование метаболизма увеличивали концентрацию мозга амфетамина на коэффициент 5, что свидетельствует о том, что метаболизм является более важным, чем почечной экскреции в качестве способа устранения амфетамина, по крайней мере, в той разновидности (18). В человеческих субъектах, получающих 1500 мг аскорбиновой кислоты в день до введения амфетамина, 24-часовой экскреции одного 30 мг дозы препарата была уменьшена в среднем на 38 процентов, независимо от pH мочи, хотя острых фармакологических эффектов препарата не были изменены с помощью предварительной обработки аскорбиновой кислоты. Там не было никакого увеличения гидроксированных метаболитов для учета меньшего количества амфетамина выделяемого (19).

Окончательный сборник информации о фармакологии и метаболизме амфетамина был опубликован в 1970 году (20), а также обширный обзор амфетамина метаболизма у млекопитающих, включая человек, появился в 1976 году (11).

АНАЛИТИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА

Разработка методов достаточно чувствительным, специфическим и воспроизводимым для идентификации и измерения амфетамина в биологических жидкостях имеет важное значение, потому что есть необходимость в *esta*- Блиш терапевтические дозы и концентрации в плазме, чтобы понять, толерантность и стереоизомерные эффекты, осуществлять токсичность исследования, а просто идентифицировать потребителей наркотиков. Концентрации амфетамина, в моче, даже после небольших доз, достаточно высоки, чтобы обнаружить большинство методов, доступных для клинических лабораторий. Тем не менее, концентрации в плазме крови, как правило, в 5-100 нг / мл диапазона. Методы, используемые включали ультрафиолетовое (УФ-спектрофотометрии), тонкослойной хроматографии (ТСХ), флуорометрию, иммуноанализа, газовой хроматографии (ГХ), и в сочетании газовой хроматографии / масс-спектрометрии *trometry* (ГХ / МС).

Количественный метод УФ, с преимуществами относительной скорости и простоты для целей скрининга, был сообщен в 1968 год *amphe- tamine* экстракт из мочи, крови или гомогената ткани *oxi- dized* сульфата церия, используя 0,8 N HCl в качестве каталитического агент, с образованием продукта реакции с хорошо определенной кривой УФ-поглощения (**максимум 287 нм,**

$\lambda_{\text{Г}}$ $\lambda_{\text{мин}}$ 253 нм в гексане). Чувствительность составляет 0,5 мкг / мл, но этот метод не смогло различить амфетамин и метамфетамин (21).

До начала 1970-х лет, флуориметрия была наиболее широко используемым методом для количественного анализа биогенных аминов и амфетаминов. Флуориметрический метод, основанный на преобразовании амфетамина к его *diHy-* производного *drolutidine*, использовал автоматизированный прямоточный *appar- Atus* для извлечения дериватизированного препарата из мочи (22). Предел обнаружения 0,15 мкг / мл, а 2-фенилэтиламин и 2-амино- гептана дали ложные положительные реакции, флуориметрии в сочетании с ТСМ широко используются, особенно для скрининга образцов мочи для амфетамина. Так, например, препараты в моче могут быть разделены и концентрируются путем XAD-2 смолы, хроматографируют на силикагеле

подход шей системы растворителей, и опрыскивают с реагентом цвета. SE- quential распыления этанольным нингидрина-фенилацетальдегид, aque- OUS фосфата натрия, а затем п-диметиламинобензальдегид был показан, чтобы отличать амфетамин от других первичных аминов forensic и токсикологического интереса, таких как мескалин, DOM, фенил- пропаноламин,

β-фенилэтиламин, бензокаин, chlorphentermine, и

новокаин. Окончательный спрей с хромотроповой кислоты было обнаружено, что необходимо отличать амфетамин от 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA). Предел обнаружения 2 мкг для амфетамина был сообщен по этой методике (23). Флуорескамин (4-фенил-спиро [фуран 2 (H) 1'-phthalen] - 3,3'dione) реагент спрей был установлен, что более чувствителен, чем нингидрин, обнаружение 250 нг амфетамина в экстрактах мочи следующего ТСХ. Метамфетамин не реагирует с Fluore- scamine (24). Методика флуорескамина была адаптирована к spectrodensitometry на месте тонкослойных хроматограмм для количественного определения амфетамина в экстрактах мочи без элюирования в. Растворитель СИСТЕМА, этилацетат: метанол: вода: аммиак (85: 13,5: 10: 0,5) использовали для отделения амфетамина от посторонние флуоресцентного материала. Концентрация 0,25 мкг / мл была обнаружена (25). 4-хлор-7- нитробензо-2,1,3-оксадиазола (NBD-Cl) также используется для формирования флуоресцентного производного амфетамина в моче и крови экстрактов перед разделением с помощью ТСХ, а интенсивность флуоресценции использовали в качестве количественной меры от амфетамина настоящего времени. Чувствительность достаточна для измерения терапевтической концентрации в крови (10-100 нг / мл) (26). Хотя любой первичный или вторичный амин будет давать флуоресцентное производное с NBD-Cl, анализа ТСХ с использованием системы двух растворителей [например, пентан: диэтиловый эфир (1: 1) или метанол: четыреххлористый углерод (80: 30)] могут быть использованы чтобы отделить амфетамин из соединений, которые могут давать ложные результаты (27), и интенсивность флуоресценции используется в качестве количественной меры амфетамина настоящего времени. Чувствительность достаточна для измерения терапевтической концентрации в крови (10-100 нг / мл) (26). Хотя любой первичный или вторичный амин будет давать флуоресцентное производное с NBD-Cl, анализа ТСХ с использованием системы двух растворителей [например, пентан: диэтиловый эфир (1: 1) или метанол: четыреххлористый углерод (80: 30)] могут быть использованы чтобы отделить амфетамин из соединений, которые могут давать ложные результаты (27), и интенсивность флуоресценции используется в качестве количественной меры амфетамина настоящего времени. Чувствительность достаточна для измерения терапевтической концентрации в крови (10-100 нг / мл) (26). Хотя любой первичный или вторичный амин будет давать флуоресцентное производное с NBD-Cl, анализа ТСХ с использованием системы двух растворителей [например, пентан: диэтиловый эфир (1: 1) или метанол: четыреххлористый углерод (80: 30)] могут быть использованы чтобы отделить амфетамин из соединений, которые могут давать ложные результаты (27).

Некоторые анализы, разработанные для амфетамина не требуют хроматографического разделения. Как мало, как 10 нг / мл амфетамина в плазме де- регистрируемый с помощью ферментного анализа, основанного на N-метилование препарата с образованием радиоактивного метамфетамин с помощью кроличьей легочной N- метилтрансферазы и S-аденозил-L- [метил - з Н] метионин в качестве донора метила. Чувствительность, специфичность и воспроизводимость была достигнута путем комбинации нескольких процедур экстракции и сушки, используемых до жидкостного сцинтилляционного счетчика (28).

Для большого числа образцов или для быстрого скрининга, иммунологические методы часто являются методом выбора. Они не требуют обширной экстракции биологических материалов или высокой степени мастерства в работе. Радиоиммунологические (РИА) зависит от конкуренции между немеченым лекарственным средством в образце и известного количеством меченого радио- препарата для связывания на специфических антителах наркотиков в кроличьей сыворотке. Антитела в некоторых анализах RIA для амфетамина связывает одинаково хорошо с метамфетамин, но метод может обнаружить 30 нг / мл амфетамина в моче (29). Один РИА занимает около 40 минут, но несколько образцов можно работать одновременно (30). Другой общий иммуноанализ, HIT, основан на связывании фермента (лизоцим) к молекуле амфетамина с образованием реагента антигена. Антитело связывает лекарственное средство и его прикрепленный фермент, инактивировать лизоцим. Любой свободный амфетамин присутствует в образце конкурирует с лекарственно-ферментный комплекс для сайтов связывания антител; в то время как несвязанный фермент тогда свободен гидролизовать клеточные стенки бактерий, используемых в качестве

показатель в анализе. Очистка суспензии клеточных стенок (уменьшение оптической плотности) пропорционально количеству ферментной метки вытесненного из антитела и, следовательно, к количеству ком- петинг свободного лекарственного средства, присутствующего в образце. ЕМТ настоящего времени не может быть использовано для крови, и он подвержен интерференции лизоцима естественным образом присутствует в некоторых образцах мочи и к ложноотрицательным из-за инактивации фермента в щелочной моче. Тем не менее, она занимает только одна минута, чтобы выполнить, это как чувствительный и специальный в RIA, и это дает полуколичественные результаты, основанные на calibra- графах Тион (30).

Газовая хроматография (АЯ) была использована по крайней мере, с 1969 по mea- surement амфетамина в моче и крови. Газовая хроматография экстрактов, после добавления N, N-диметиланилина в качестве внутреннего стандарта, на колонке с покрытием 5 процентов KOH + 10 процентов саг- bowax 6000 и с использованием пламенно-ионизационным детектором (FID), была достаточно чувствительны, чтобы обнаружить TIVE 0,1 мкг / мл амфетамина в моче (31). Быстрый метод ОГО разработан для повседневного использования в скрининге мочи диэтиламина их включение в качестве внутреннего стандарта и подтверждения получения производного кетона амфетамина. Пределы обнаружения были 0,01 нг / мл (32). Для количественного определения амфетамина в крови ГМ был рекомендован ряд конкретных шагов. Они включали использование стеклянной посуды с тефлоновым покрытием, чтобы свести к минимуму поглощения, соехтрас- ции с поглотительным амином (диэтиламин), образование летучего соли не- HCl, получение производного трифторацетамида, и использование внутреннего стандарта (1-адамantanamin HCl). Это ком- ание условий дали почти полное (98 процентов) восстановление амфетамина из крови и концентрации 10-100 нг / мл были измеримы (33).

Из-за пределы чувствительности пламенно-ионизационного детектора, обнаружение захвата электронов (ECD) после формирования подходящего deri- vatives предлагает преимущество по сравнению с FID для ОГО анализа очень низких концентраций амфетамина, часто присутствующего в образцах крови. Гептафторбутил (34), трихлорацетамида (35), и N-ацетил (36) производные, в частности, было зарегистрировано для этой цели. Колонку Оп-ацилирование амфетамина с N- (трифторацетил) имидазола, либо с N- (heptafluorobutyl) имидазола, также сообщалось. Производные были сформированы количественно и воспроизводим, так- Инг техники, подходящей для количественного анализа. В имидазоле реагенты имеют преимущество над ацилхлоридами или ангидридами кислот, что ни в кислотах выпускаются **в хроматографическую систему (37).** **Детектор Ni, но чистые соединения, а не биологические экстракты, используемые в исследовании (38).** ГХ-ECD производного трихлоруксусной, **а также с использованием в Детектор Ni,** был способен измерять концентрации амфетамина как низко как 5 нг / мл в плазме (39). Хотя детекторы ЕС могут Im- доказать чувствительность, они могут иметь недостатки чрезмерного фона или тяжелую закалку из-за воду и растворитель. Пред- liminary исследования анализа аминов с помощью ГХ-ECD с использованием модельных соединений, таких как фенилэтиламина и использованием стеклянных капиллярных колонок, предположили, что высокая разрешающая способность капиллярных колонок может улучшить количественный анализ на уровне subnanogram

нейротрансмиттеров и родственных им соединений, таких как амфетамин (40). ГХ анализ метаболита N-Гидрохуамphetamine затруднено из-за его нестабильности при нормальных условиях ГХ, но декомпозиции было показано, что в результате каталитической активности твердой подложки, а не термических условий или окисления в колонне. Анализ прямых ГХ было обнаружено, что возможно без дериватизации, с использованием колонки, содержащей 0,2 процента саг- bowax 20M со стеклянными шариками в качестве вспомогательного материала, эксплуатируемый при 100 ° C (41).

Для анализа выбранного мониторинга ионов лекарственных препаратов и метаболитов в биологических жидкостях получение производных часто желательнее, чтобы достичь лучших газохроматографических характеристик и для генерирования ионов в массе-спектрометре, которые являются более подходящими, чем те, порожденными исходным лекарственным средством. Ацетилирование, триметил- силилирование (TMS), а perfluoroacylation получением производных амфетамина, которые показывают хорошие характеристики ГХ и МС (39).

Некоторые процедуры ацетилирования требуют времени реакции до нескольких часов и, следовательно, не подходит для быстрого анализа. Недавно было сообщено быстрое и количественное ацетилирование амфетамина, в котором ангидрид трифторуксусной кислоты была использована в присутствии КОММЕРЧЕСКОГО Curic трифторацетата в качестве катализатора. В реагент действует на amphetamine в форме либо свободного основания или соли, и метод не требует предварительной экстракции уличных образцов лекарственных средств для удаления adulterants. Применение этой процедуры дериватизации к анализу ГХ / МС позволило обнаружить амфетамин на уровне пмоль, в течение примерно 10 мин общего времени анализа (42).

Для целей массовой спектральной идентификации первичных аминов в образцах мочи, производные изотиоцианатом были показаны, обладают некоторыми преимуществами по сравнению с производным TMS из-за фрагментации закономерно- крачек, которая устраняет ЦНС-содержащий остаток из молекулярного иона и позволяет удержание заряда на фрагмент, содержащий фенильную группу, (43). Изотиоцианат производное амфетамина, как утверждают, даже более стабильна, чем производное трифторацетамидной. Посредством мониторинга молекулярного иона с изотиоцианатом производного отношение сигнал-шум 3: 1 была достигнута в течение 1 нг вводили в колонку (44).

Dansylation амфетамина с 5-диметиламино-1-нафталин сульфаты хлорида fonyl дает производное УФ-поглощения, который использовали в анализе для амфетамина в моче и тканевых гомогенатах. **Amphetamine-2 ЧАСs был добавлен в моче (pH 10) до экстракции и dansylation. Бензольный экстракт** дансил-амфетамина был chromatographed на тонкослойных пластинах, разработанных с бензолом: triethyla- шахты (8: 1), и зона идентифицируется с помощью УФ-спектроскопии (365 нм), элюировали этилацетатом, сушили и хроматографируют на apo-Theg пластины (петролейный эфир: толуол: уксусная кислота: вода, 133: 67: 170: 30 об / об). Конечный экстракт анализировали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения с использованием выбранного мониторинга ионов. Линейная зависимость между концентрацией амфетамина и ионным током реакцией была дока- зана в диапазоне 5 пг до 500 нг, а так же мало, как 0,1 нг / мл амфетамина были обнаружены в моче. Однако, поскольку интер-

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОЦЕДУРА

Экспериментальная процедура для экстракции, дериватизации и GC / MS анализа амфетамина идентична процедуре, описанной в главе 9 для анализа метамфетамина для меж- конечного стандарта, **за исключением (amphetamine-2 ЧАС₃ используется вместо methamphetamine-**

2 ЧАС₅) и конкретных ионов контролируется. Следовательно, концентрации, оба препаратов может быть измерены одновременно путем добавления deuterated аналогов двух препаратов в биологический образец, для использования в качестве внутренних стандартов. Затем во время сбора данных, ионные Тока в четырех значениях m / z контролируются. Эти m / z 232, 235,

246 и 251, которые соответствуют протонированной молекуле ионов для производных амфетамина трифторацетамида, **amphetamine-2 ЧАС₃ метамфетамин и methamphetamine-2 ЧАС₅, соответственно.**

Стандарты и реагенты

d-амфетамин гидрохлорид можно приобрести у Applied Science Laboratories, State College, PA 16801, для приготовления стандартных растворов. **amphetamine-2 ЧАС₃ гидрохлорид, используемый в развитие** конфликтной этой процедуры был синтезирован по методике литературы (53). Дейтерий-меченных амфетамин имел изотопную чистоту

99,9 процента (2 ЧАС₃).

Для подготовки калибровочных графиков и рабочих стандартов, растворы амфетамина и amphetamine-2 ЧАС₃ получают следующим образом. Взвешивание в 100-мл мерную колбу около 12,6 мг гидрохлорида амфетамина и записывают его вес с точностью до 0,1 мг Эквивалентный вес свободного основания рассчитывается путем Перемножение вес амфетамина гидрохлорид 0,79. Растворить измеренный амфетамин примерно 75 мл метанола, а затем добавляет дополни- тельного метанола с получением ровно 100 мл раствора.

В следующих

абзацы это решения будет именоваться как «0,10 мг / мл исходного раствор», хотя оно должно быть меченными с его фактическими концентрациями ции на основании точного измеренного веса амфетамин hydrochloride. Серия рабочих стандартных растворов могут быть получены путем соответствующего разбавления этого раствора, как описано в главе 2.

Исходный раствор amphetamine-2 ЧАС₃ получают таким же образом. Для измерения амфетамина в жидкостях тела в пределах диапазона концен- трации от 1 до 500 нг / мл, добавление приблизительно 40 нг внутреннего стандарта, чтобы каждые мл образца является удовлетворительным. Это может быть удобно сделать путем добавления 100 мкл 400-нг / мл amphetamine-

2 ЧАС₃ метанольный раствор на каждый мл образца. Подготовьте / мл раствора внутреннего стандарта 400 нг путем разбавления 1 мл 0,10 мг / мл исходного раствора amphetamine-2 ЧАС₃ до 250 мл метанола.

Хранить запас и стандартные растворы в хорошо закупоренных или блокированных стеклянных сосудов в темноте при температуре ниже 0 ° C.

экстракция

Передача 1 мл образца (цельной крови, плазмы или мочи) в 20-мл пробирку, снабженную тефлоновой футеровкой винтовой крышкой (от 0,5 до 2 мл образца может быть использован, но оно должно быть точно измерено).

Добавьте 100 мкл 400-нг / мл amphetamine-2 ЧАС₃ solution и вихрь в течение примерно 10 сек. Разрешить образец для уравнивания в течение примерно 15 мин, а затем увеличить pH до более 10 путем добавления 1 мл K₂ Колорадо-3- насыщенная дистиллированная вода. Извлечение основной смеси с 5 мл 1-хлорбутана, осторожно смешивая содержимое в течение 30 мин с помощью моторизованной качалки или ротатора. Центрифуга в течение 5 мин, а затем передать органическую фазу (сверху) на другой 20-мл пробирку с помощью одноразовой пипетки Пастера. Извлеките амфетамин и другие органические основания из органической фазы в водную кислоту добавления 3 мл 0,2 NH₂ TAK 4 и осторожное перемешивание в течение по крайней мере 15 мин. Центрифуга и удалить верхнюю органическую фазу путем аспирации. Добавить 0,5 мл 10 N NaOH к водной фазе, перемешать содержимое и проверить pH, чтобы убедиться, раствор сильно щелочной (pH > 10). И, наконец, рекстракции органические основани из водного щелочного реше- ции путем добавления 5 мл хлористого метилена и осторожного перемешивания в течение по крайней мере 15 мин. Центрифуга в течение 5 мин, Аспирируйте от верхнего водного слоя, и передачи с помощью одноразовой пипетки Пастера Экстракта хлористого метилена (нижний слой) к силилированным концентрациям TOR трубки, имеющей объем по меньшей мере, 5 мл, конического дна, и тефлоновой футеровкой завинчивающейся крышкой. Добавьте 10 мкл диметилформамид, чтобы действовать в качестве «хранителя растворителя», чтобы свести к минимуму потери испарительного амфетамина. Удалите метиленхлорид выпаривания при слабом токе азота или отфильтрованного воздухом при нагревании трубки не выше 40 ° C. Когда объем экстракта уменьшилось до приблизительно 10 µl, добавить 15 мкл N-метил-бис (трифторацетамид) «MBTFA» (Pierce Chemical Co., Rockford, IL 61105). Закрывают пробирку и нагревают ее при температуре 70 ° C в течение 15 мин. Ограничен труба может храниться под охлажде- до Ц И А Ц / МС GX-анализ не готов быть выполнена. Незамедли- тельно до анализа, позволяют трубки нагреться до комнатной темпера- тура. Ограничен труба может храниться под охлажде- до Ц И А Ц / МС GX-анализ не готов быть выполнена. Незамедли- тельно до анализа, позволяют трубки нагреться до комнатной темпера- тура. Ограничен труба может храниться под охлажде- до Ц И А Ц / МС GX-анализ не готов быть выполнена. Незамедли- тельно до анализа, позволяют трубки нагреться до комнатной темпера- тура.

ГХ / МС анализ

Экспериментальные условия для анализа ГХ / МС для амфетамина трифторацетамида заключаются в следующем:

ГХ колонок: 1,8 м x колонок 2 мм (ID), стекла упакованы с 3 процентами OV-17 на 100/120 меш Gas Chrom Q (Applied Science Laboratory, State College, PA 16801).

Carrier и газ-реагент: Метан, 15-20 мл / мин

Температура: Инжектор, 260 ° C
Колонка, 120 ° C, изотермический ГХ / МС
линии передачи, 260 ° C Источник ионов,
160 ° C

В этих условиях, амфетамин трифторацетамид должны элюировать в 2-х до 4 мин в виде узкого, симметричный пик.

до начала ГХ / МС анализ образцов, производительность общей системы ГХ / МС должна быть оценена и оптимизирована, как описано в главе 2. Ионы, которые будут происходить при отслеживаемые м / г и 232

235. Они соответствуют протонированной молекуле ионов для ampheta-

tamine трифторацетамид и amphetamine-2 ЧАС³ трифторацетамид соответственно. С отбракованных клапана в положении, отбракованных инжектируется от 2 до 6 мкл органического экстракта в газовый хроматограф. Примерно через 1 мин, переключить отбракованный клапан так, чтобы поток ен- несущей шины газа поступает в источнике ионов масс-спектрологии метра, и начинают сбор данных. Когда амфетамин трифтор- ацетамида пика элюирования прекратит сбор данных и вернуть отбракованный клапан в положение отбракованного.

Количество амфетамина в образце определяется mea- Suring высот (или области) или амфетамин **трифторацетамидом и amphetamine-2 ЧАС³ трифторацетамид пика профилей токов выбраны ионными** («ионные хроматограммы») и связанные отношения высот пиков к калибровочной графике. Вычислить концентрацию амфетамина в образце путем деления измеренного количества амфетамина точным объемом образца, экстрагированных.

Обсуждение процедуры экспериментальной

Электронный удар (EI) и химическая ионизация (CI), массы-спектры амфетамина трифторацетамида показан на рисунке 1. Наиболее распространенные ионы в спектрах ДИ масс соответствуют протонированному молекулярному иону (m/z 232) и ион аммония-крепление (m/z 249), в зависимости от того, в одиночку метан или метан и аммиак используют в качестве газообразных реагентов. Даже если процедура определяет использование метана отдельно в качестве газа-реагента, сочетание метана и аммиака также является удовлетворительным и должны обеспечивать несколько лучшую чувствительность. Возможно, наиболее важным является тот факт, что метан и аммиак ком- ание дает возможность контролировать другую пару масс ионов, если помехи встречаются при m/z 232 или 235, когда одна метан используется.

Дополнительный вариант, который можно исследовать, если помехи будут противодействовать ен- в выбранных измерениях мониторинга ионов, является, создали ел производный отличается от трифторацетамида. Для Например, уже производное ацетамида может быть получен путем замены N-ацетилимидазол для N-метил-бис (трифторацетамидной). Кроме того, могут быть использованы pentafluoroacetamide или heptafluorobutyramide производные. Производная трифторацетамида доказал удовлетворительной, но использование других производных не в полной мере оценено.

Потенциальная проблема, связанная с концентрацией органических экстрактов, содержащих амфетамин потерю лекарственного средства за счет испарения из-за его относительно высокой волатильности. По этой причине некоторые процедуры анализа амфетамина указать добавление кислоты для превращения препарата в энергонезависимую соли до концентрации экстракта. В методике, описанной здесь, потери из-за испарения нало- следующими способами. Во-первых, метиленхлорид используется в окончательной экстракции, поскольку он имеет более низкую температуру кипения (39 ° C), чем 1-хлорбутана (78 ° C). Во-вторых, небольшое количество диметилформамида добавляют непосредственно перед испарительной концентрации, чтобы действовать в качестве «хранитель растворителя.» Если эти процедуры следуют и приняты меры, чтобы не допустить концентрированный остаток оставаться на возвел кон температуре в течение Длительный период,

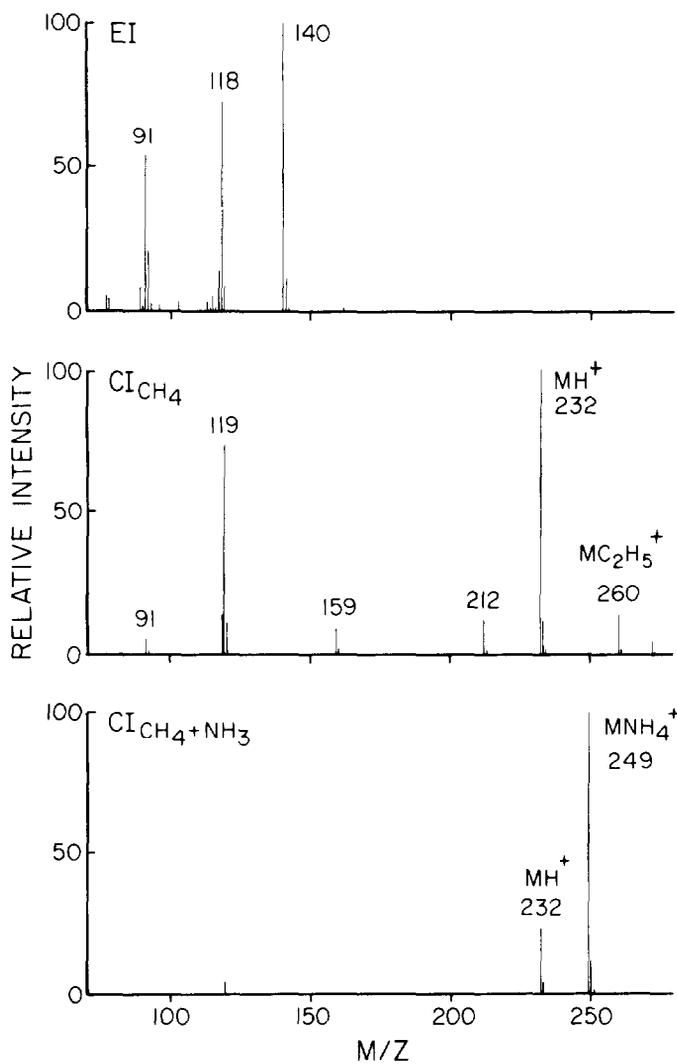


Рисунок 1. Масс-спектры трифторацетамида
Производная АМФЕТАМИНА

10. LG Дринг, RL Smith, и RT Williams. J. Pharm. Pharmacol., 18, 402 (1966). _____

11. J. Caldwell. Drug Metab. Обороты., 5, 219 (1976). _____
12. АН Беккет, НТ Coutts и FA Ogunbona. J. Pharm. Pharmacol., 25, 708 (1973). _____

13. АН Беккет и С. Аль-Саррадж. J. Pharm. Pharmacol., 25, 328 (1973). _____
14. JW Gorrod. Life Sci., 13, LVIII (1973). _____
15. АН Беккет, Р. Бойс, и GT Такер. J. Pharm. Pharmacol., _____
20, 277 (1968).
16. М. Роулэнд. J. Pharm. Sci., 58, 508 (1969). _____
17. E. Änggård, Л.-Е. Йонссон, А.-Л. Hogmark и Л.-М. Gunne. Clin. Pharmacol. Ther., 14, 870
(1973). _____
18. АК Cho, ВJ Hodshon, Б. Lindeke, и GT Мива. J. Pharm. Sci., 62 1491 (1973). _____

19. МР Kullberg и JD Гриффит. Кормили. Proc., 35, 565 (1976). _____
20. Е. С. Коста и Garattini, ред., Proc. Int. Сymp амфетамины и родственные соединения. Raven Press,
New York (1970).
21. JE Уоллес, JD Биггс и SL Лэдд. Анальный. Chem., 40, 2207 (1968). _____
22. TS Hayes. Clin. Chem., 19, 390 (1973). _____
23. КJ Басси и RC Backer. Clin. Chem., 2, 302 (1974). _____
24. Б. Клейн, JE Шихан и Е. Грюнберг. Clin. Chem., 20, 272 (1974). _____
25. J. Sherma, MF Dobbins и JC Touchstone. J. Chromatogr. Sci., _____
_____ 12, 300 (1974).
26. Ф. Ван Хоф и А. Heuyndrickx. Анальный. Chem., 46, 286 (1974). _____
27. TJ Хопен, RC Брайнер, НG Сэдлер, и RL Smith. Дж судебной Sci., 21, 842 (1976). _____

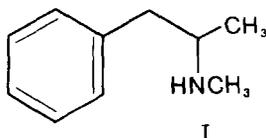
28. DS Kreuz и J. Аксельрод. Наука, 183, 420 (1974). _____
29. А. Кастро и Н. Малкус. Местожительство Commun. Химреагент Pathol. Pharmacol.,
16, 291 (1977).
30. RO Bost, СА Sutheimer, и я Саншайн. Clin. Chem., 22, 789 (1976). _____

31. КДР Setchell и JDN Купер. Clin. Хим. Acta, 35, 67 (1971). _____
32. JE О'Брайен, В. Zazulak, В. аббатство, О. Hinsvark. J. Chrom- atogr. Sci., 10, 336 (1972), _____
33. RB Брюс и WR Maynard, младший Anal. Chem., 41, 977 (1969). _____
34. JS Нунан, PW Murdick и RS Ray. J. Pharmacol. Exp. Ther., _____
_____ 168, 205 (1969).
35. PA Тоузлэнд и РН Скотт. Clin. Хим. Acta, 25, 75 (1969). _____
36. Г. Вругаард и К. Расмуссен. J. Chromatogr., 147, 476 (1978). _____
37. GR Уилкинсон. Анальный. Lett., 3, 289 (1970). _____
38. E. Änggård, в Е. Коста и С. Garattini, ред., Амфетамины и родственных соединений. Raven Press, Нью-Йорк, стр. 191 (1970). _____
39. JJ Франкен и MMF Tjibbels. J. Chromatogr., 91, 425 (1974). _____
40. АН Беккет и Р. Achari. J. Chromatogr., 135, 200 (1977). _____
41. А. В. Clin. Toxicol., 8, 225 (1975). _____
42. Н. Нарасимхачари и П. Vouros. Анальный. Biochem., 45, 154 (1972). _____
43. Н. Нарасимхачари, РО Фридель, Ф. Шлеммер и Дж.М. Дэвис.
J. Chromatogr., 164, 386 (1979).
44. TJ Дэниелсон и А. бултон. Biomed. Масса Spectr., 1, 159 (1974). _____
45. КН Пауэрс и МН Эберт. Biomed. Масса Spectr., 6, 187 (1979). _____
46. D. Eskes. J. Chromatog., 117, 442 (1976). _____
47. L.-M. Gunne. Biochem. Pharmacol., 16, 863 (1967). _____
48. SB Matin, SH Wan и JB Knight. Biomed. Масса Spectr., _____
4, 118 (1977).
49. J. Гал. Biomed. Масс-Спектр., 5, 32 (1978). _____
50. DB Кэмпбелл. J. Pharm. Pharmacol., 21, 129 (1969). _____
51. AK Cho, Б. Lindeke, ВJ Hodshon и DJ Jenden. Анальный. Chem., 45, 570 (1973). _____
52. В. Lindeke и AK Cho. Acta Pharm. Suecica, 9, 363 (1972). _____

Метамфетамин

Первый синтез метамфетамина (д-N, α -dimethylphenethylamine), мощный центральной нервной SYSTEME стимулятор, было сообщено в 1919 году (1). Метамфетамин с тех пор был использован клинический в качестве аналептика, чтобы противодействовать спирт, барбитураты или наркотический ступор, а также во время операции, чтобы поддерживать давление крови больных под наркозом (2). Клиническое применение препарата сократилось в последние годы, но метамфетамин продолжает злоупотреблять. Он доступен на улице, как Methedrine таблетки или как незаконный препарат, которые часто вводили внутривенно. Как и другие стимуляторы группы амфетамин, метамфетамин производит начальное состояние эйфории. Тем не менее, это чувство сопровождается restlessness, возбуждением, раздражительностью и иногда крайней паранойей, а также депрессия и истощение, как стимулирующее действие препарата стирается.

Вследствие этого существует сильная тенденция к ДОГОВОРУ использование time для того, чтобы поддерживать «высокий» и избежать неприятных последствий. Тolerantность развивается быстро в результате многократного использования и увеличения дозы необходимы для поддержания первоначального уровня стимуляции. Физическая зависимость не была доказана, но вероятность продолжения использования очень высока (3). Метамфетамин был обнаружен в тканях новорожденных человека, и плод редко доживает до срока, когда мать является метамфетамин обидчика (4).



Для судебно-медицинских целей, это может быть необходимо использовать процедуры, которые могут идентифицировать стереоизомеры, потому что 1-метамфетамин может быть найден в моче людей, использующих по крайней мере, один из распространенных, не являющихся рецептурных рецептов ингаляторов. Как и в случае амфетамина, изомеры различаются по своей фармакологической активности; 1-метамфетамин имеет большие симпатомиметические свойства при d-метамфетамин имеет большие анорексию и стимулирующие свойства (5).

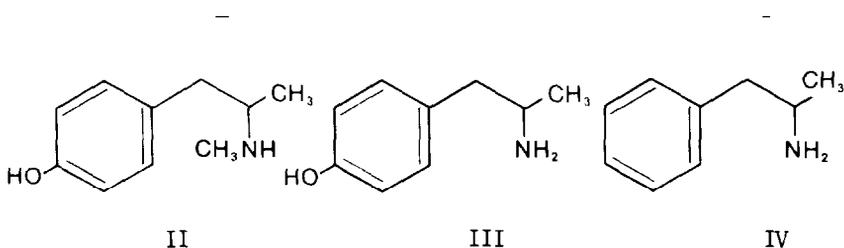
Проведено сравнительное исследование на крысах показали, что N-метил ИСТОЧНИКОМ метамфетамин Рен-менее токсичен по отношению к печени системы микросомальных ферментов, чем амфетамин, но у этих животных метилированный препарат был более активным, и требует меньшие дозы для достижения того же фармако-

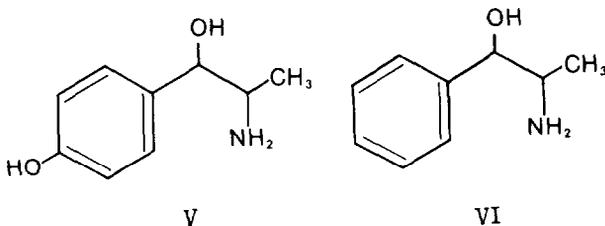
логическая эффект (6). Кроме того, у крыс, было обнаружено, метамфетамин, чтобы вызвать краткосрочные (менее 6 ч) истощение норадреналина и серотонина в мозге и длительное (более 48 ч) истощение сердца норадреналина. Амфетамин был обнаружен в этих тканях после введения метамфетамина, а также р-гигиенического droxyl производного амфетамина и одного или более неустановленной мета- bolite (ов), представленной радиоактивностью. Последнее, более полярные, чем исходный препарат или амфетамин, сохраняются при более высоких концентрациях в сердце, чем в ткани головного мозга, распараллеливание временной ход норадреналина истощения. Метамфетамин и амфетамин уровни были в центре ниже, чем в мозге и исчезли из ткани сердца в течение 5 часов (7).

Метаболизм и фармакокинетики

Изучение 14 C-метамфетамин метаболизм у человека показали, что около 90 процентов от 14 C выводились с мочой в течение четырех дней. Средние 22 процентов от дозы выводится с мочой в течение 24 ч в неизменном виде, и 15 процентов были выведены как 4-гидрокси- метамфетамина (II).

Незначительные метаболиты включают 4-Hydroxyamphetamine (III, 1 процент), амфетамин (IV, 2-3 процентов), 4-hydroxyamphetamine (V, 1-2 процента), норэфедрин (VI, 2 процента), гиппуровую кислоту (5 процентов) и кислотно-лабильной предшественник benzylmethyl кетона (1 процент). Средний лишь 62 процентов от радиоактивности проглоченной появился в моче в течение 24 часов (8). Радиоактивность не контролировали пот или слюну, хотя метамфетамин известно из организма этих (9) маршруты. Несмотря на то, ее продукты составляют лишь 4 процента от дозы у человека, бета-гидроксилирование является существенным, так как норэфедрин и 4-гидрокси норэфедрин могут выступать в качестве ложных нейротрансмиттеров (10). Гидроксилированные производные methamphetamine из организма в основном в качестве конъюгатов глюкуроновой кислоты. В тех метаболитов, где произошли как parahydroxylation и N-деметилирования, некоторые данные свидетельствуют о том, что последний имеет место в первую очередь. N-деметилирования в какой-то степени стереоспецифических, происходит более легко с г-изомера метамфетамина, чем с L-изомера (7,11).





Изменение pH мочи было показано, чтобы повлиять на количество неизмененного метамфетамина из организма в моче человека. Когда моча метаболически подкисляется проглатываниями NH_4Cl или подщелачивается путем глотания таблетки из NaHCO_3 , 16-часовая экскреция исходного препарата была гораздо больше в кислоте, чем в щелочной моче. В условиях щелочной мочи, субъективные эффекты метамфетамина были более длительными, показанием T_{1/2} реабсорбции и более удержания в организме (11).

Терапевтические дозы метамфетамина в человеке являются относительно небольшими, 5-10 мг. Препарат является умеренно сильным органическим основанием ($\text{pK}_a = 9,89$) (11), и, следовательно, концентрации в крови, как правило, с низкими (20-60 нг / мл), хотя так же, как 550 нг / мл были сообщены в случаях передозировки.

АНАЛИТИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА

Количественный метод с использованием тонкослойной хроматографии (ТСХ) мочи экстрактов на щелочных пластинах с силикагелем, с последующим спектро- фотометрическим определением цветной реакции в точках разра- ботки по данным ТСХ, был использован для измерения метамфетамина в моче лошадей. Интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству лекарственного средства в диапазоне 200-2000 мкг (12). Улучшение чувствительность (10 нг / мл) достигается за счет ультрафиолетовых спектрофотометрий экстрактов из мочи, сывороток, или после того, как тканевые гомогенаты окисляются с сульфатом церия, но процедура была относительно неспецифической для метамфетамина (13).

Флуориметрический метод, который в принципе может быть использован для количественного титрования метамфетамина, если препарат впервые был очищен хроматографически, был использован для измерения основных аминов в моче. Препараты были преобразованы в высоко флуоресцентные соединения по реакции с 7-хлор-4-нитробензо-2-окса-1,3-диазол (хлорид NBD) (14). Этот метод фактически был использован для скрининга метамфетамина в моче человека, со спецификой определяется наличием двойных флуоресцентных пятен на ТСХ, как в соответствующих цветовых и РЧ значений в производных NBD метамфетамина и его метаболита, amphetamine (15).

Из-за небольшого количества метамфетамина, обнаруженных в крови, были необходимы улучшения как в чувствительности и специфичности методов анализа. Способ ОГО с использованием обнаружения электронно-захвата (ECD)

производный heptafluorobutyramide препарата в крови экс-тракты были чувствительны к 20 нг / мл метамфетамина, количество обнаружено в крови человека 6 ч после 5 мг дозы (16).

В другой

Применение GC-ECD, в которых наблюдали терапевтические концентрации в крови метамфетамина, производное трихлорацетамида был подготовлен до хроматографии на 3 процента OV-1. Это deri- vative был выше в хроматографических characteris тиков и более чувствительным к ECD, чем либо heptafluorobutyramide или пента- фторбензамид.

Концентрации в крови в течение периода 24-часового были обнаружено, что в диапазоне от 10 до 20 нг / мл после 12,5 мг дозы метамфетамина, но этот метод был способен измерять количество столь же низко как 25 пг (17).

Человек мочевых экскреция нескольких амфетамина препаратов, включая высокую метамфетамин, следовала процедура ОИ с добавлением фенолэтиламина в качестве внутреннего стандарта и использования пламенно-ионизационного детектора (FID). Препарат хроматографируют в качестве производного ацетамида на упаковке колонке с покрытием 8 процентов ослабленным этиленгликольадипат, но чувствительность сообщалось только в терминах мкг базы / мг креатинина (18). Аналогичным способом, кровь сначала обрабатывают вольфрамовой кислоты для осаждения белков и N-propylamphetamine был добавлен в качестве внутреннего стандарта. Супернатант был сделан сильно основным для эфира экстракции metham- phetamine и внутреннего стандарта до превращения в асета- производных Мид для анализа ОГО-FID.

Для клинического применения, процедура для измерения метамфетамина в моче с помощью ГХ-ПИД был подписан и для устранения ложных срабатываний, вызванных меж- Fering веществ и сократить время анализа до 30 мин. Во-первых, препарат был определен в виде свободного основания на 10 процентов Ariezon L-10-процентной колонке КОН. Экстракты найдено положительные со ссылкой на GC пики стандартных растворов были затем хроматографируют на 3 процента ослабленных ОВ-17, с по-колонкой дериватизацией с трифторуксусной anhy- dride. β -фенилэтиламин был внутренний стандарт в обоих GC Sys- TEMS. Количество метамфетамина было измерено с точностью \pm 7 процентов, а чувствительность была 0,1 мкг / мл. Процедура была быстрой адаптацией к анализу большого количества образцов (20,21).

Хотя хроматографические методы оказались весьма чувствителен к метамфетамин, добавление масс-спектрометрии часто желательно для подтверждения его структуры, даже в рутинных анализах, такие как мониторинг в спортивных соревнованиях. Для подтверждения фабричной калибровки такого рода, то трифторацетилюет производный метамфетамин был включен в ОМ / МСЕ протокол, который обнаружен 0,3 мкг / мл метамфетамина человеческой мочи (22). ГХ / МС был сла- ploued несколько лет назад как метод идентификации, но не количественному, метамфетамина в моче участников спортивных мероприятий, с подтверждением на основе спектров N-ацетил и производных N-пропионил (23) ,

Иммунологические методы были использованы при скрининге жидкостей организма для метамфетамина и имеют преимущество высокой степени чувствительны и не требующую процедуры экстракции. Тем не менее, те, в предварительном отправленном использовании не могут различить амфетамин и метамфетамин, и они подвержены помехам со стороны другими phenylethylamines (21). Радиоиммунологическая (RIA) искушал успешным в выявлении метаболитов метамфетамина в слюне крысы после инъекции препарата. Ни сам, ни его 4-гидрокси производный метамфетамин был реактивным в процедуре RIA, но слюна крысы давала положительные реакции RIA, которые привели от амфетамина, 4-hydroxynorepine- drine и 4-Hydroxyamphetamine, либо отдельно, либо в комбинации (25). Коммерческая система RIA доступна и может быть использована для количественного измерения фенэтиламинам как в крови и моче (26). Однако, его динамический диапазон весьма ограничен и со- вательно он в основном используются в качестве метода скрининга с кон- тверждения и количественной, достигнутым с помощью других методов. Методика EMIT широко используется для обнаружения фенэтиламинам в моче. Более 70 тестов в час может проводиться с уровнем обнаружения 2 мкг / мл мочи (27).

Экстракционные растворители, используемые для метамфетамина включают диэтиловый эфир (19,22,23), n-гексан (13,17), пентан (16), циклогексан (28) и хлороформ (14,15,18,21), в условиях pH в пределах от 8 до 14. экстракции обратно в кислоту иногда используется (21). Кровь про- teins может быть осаждена и кислотные вещества удаляют путем обработки с вольфрамовой кислотой до экстракции метамфетамина на alka- линии (pH 17,19). Восстановление 100 процентов было сообщено для экстракции препарата из крови с пентаном (16) и из мочи хлороформа (18), как после подщелачивания с помощью NaOH.

Обширный обзор ГХ и ГХ / МС амфетаминов и их производных было опубликовано (29).

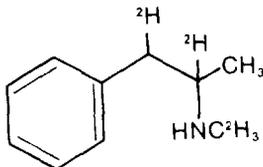
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОЦЕДУРА

Концентрации в крови метамфетамина следующие нормальные дозировки, как правило, находятся в низком диапазоне нг / мл. Следовательно, процесс экстракции включает в себя очистку слюны извлечения для того, чтобы про- смотри относительно чистый экстракт, который в свою очередь, допускает ГХ / МС mea- surement от метамфетамина с очень высокой чувствительностью и грамотному ОДВТ вероятность помех от эндогенных компонентов из кровь. После добавления дейтерий-меченных внутреннего стандарта, образец изготовлен сильно щелочной раствором Bonate насыщенным калия саг- и экстрагировали 1-хлорбутана. Methamphet- амин и другие органические основания снова экстрагируют в разбавленную сульфаты furic кислоты, который затем подщелачивают с помощью гидроксида натрия и повторно экстрагируют с помощью 1-хлорбутана. Органический экстракт затем обрабатывают ангидридом трифторуксусной кислоты, чтобы преобразовать метамфетамин его N-трифторацетамидной производное до концентрации путем выпаривания. Количественное достигается за счет выбранного иона мониторинга с использованием химической ионизации с метаном в качестве газа-реагента.

Стандарты и реагенты

Д, 1-метамфетамин гидрохлорид, используемый в развитии этого метода был приобретен из Национального института по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами.

Он имел диапазон точки плавления 170-172 ° С. Нет примеси не были де- регистрируемый либо газовой хроматографии или масс-спектрометрии. д, 1-мет- amphetamine-2 ЧАС₅ гидрохлорид, синтезированный в Battelle Columbus Laboratories с использованием процедуры, опубликованной (30). Расположение атомов дейтерия указывается в структуре VII. На основании масс-спектрального анализа, его изотопный состав был: 2 ЧАС₅, 94 процента; 2 ЧАС₄, 5,7 процента; 2 ЧАС₃, 0,3 процента; 2 ЧАС₂, 2 ЧАС₁ а также 2 ЧАС₀ менее 0,1 процента.



VII

Для подготовки калибровочных графиков и рабочих стандартов, растворы метамфетамина и methamphetamine-2 ЧАС₅ которые предварительно сравнению следующим образом. Взвешивание в 100-мл мерную колбу около 12,4 мг гидрохлорида метамфетамина и записывают его вес с точностью до 0,1 мг. Эквивалентная масса свободного основания вычисляется путем умножения веса метамфетамина гидрохлорида 0,805. Растворите измеренный метамфетамин в приблизительно 75 мл метанола, а затем добавить дополнительный метанол, получая ровно 100 мл раствора. В следующих параграфах это решение будет именоваться как «0,10 мг / мл исходного раствора», хотя оно должно быть меченным с его фактической концентрацией на основе точного измеренного веса гидрохлорида метамфетамина. Серия рабочего стандартные решений при энергиях может быть получена путем соответствующего разбавлением этого запаса растворов ции, как описано в главе 2.

Исходный раствор methamphetamine-2 ЧАС₅ получают в здравом образом. Для измерения метамфетамина в жидкостях организма с- в диапазоне концентраций от 1 до 500 нг / мл, добавление приблизительно 40 нг внутреннего стандарта на каждые мл образца удовлетворительное. Это может быть удобно сделать путем добавления 100 мкл 400-нг / мл methamphetamine-2 ЧАС₅ метанольный раствор на каждый мл образца. PRE-срезать с / мл раствора внутреннего стандарта 400 нг путем разбавления 1 мл 0,10 мг / мл исходного раствора methamphetamine-2 ЧАС₅ до 250 мл метанола.

Хранить запас и стандартные растворы в хорошо закупоренных или заблокированных стеклянных сосудов в темноте при температуре ниже 0 ° С.

экстракция

Передача 1 мл жидкости тела (цельной крови, плазмы или мочи) в 20-мл пробирку, снабженную тефлоновой футеровкой винтовой крышкой (от 0,5 до 2 мл образца может быть использован, но оно должно быть точно измерено). Добавьте 100 мкл 400-нг / мл methamphetamine-2 ЧАС₅ раствора и вихревые дья

около 10 сек. Разрешить образец для уравнивания в течение примерно 15 мин, а затем увеличить pH до более 10 путем добавления 1 мл K_2 Колорадо насыщенная дистиллированная вода. Извлечение основной смеси с 5 мл 1-хлорбутана, осторожно смешивая содержимое в течение 30 мин с помощью моторизованной качалки или ротатора. Центрифуга в течение 5 мин и затем транс-фер органической фазы (сверху) на другой 20-мл пробирку с помощью одноразовой пипетки Пастера. Извлеките метамфетамин и другие органические основания из органической фазы в водную кислоту добавления 3 мл $0,2 NH_2$ ТАК и осторожное перемешивание в течение по крайней мере 15 мин. Центрифуга и удалить верхнюю органическую фазу путем аспирации. Добавить

0,5 мл 10 N NaOH к водной фазе, перемешать содержимое и проверить pH, чтобы убедиться, раствор сильно щелочной (pH > 10). И, наконец, реэкстракции органические основани из водного щелочного реше- ции путем добавления 5 мл хлористого метилена и осторожного перемешивания в течение по крайней мере 15 мин. Центрифуга в течение пяти минут, Аспирируйте от верхнего водного слоя, и передачи с помощью одноразовой пипетки Пастера Экстракт хлористого метилена (нижний слой) к силилированному кон- centrator трубки, имеющей объем по меньшей мере, 5 мл, коническим дном, и тефлоновой футеровкой завинчивающейся крышкой. Добавьте 10 мкл диметилформамид, чтобы действовать в качестве «хранителя» растворителя для минимизации испарительной потери мет- амфетамина. Удалите метиленхлорид выпаривания при слабом токе азота или отфильтрованного воздухом при нагревании трубки не выше $40^\circ C$. Когда объем экстракта уменьшилось до приблизительно 10 мкл, добавляют 15 мкл N-метил-бис (трифторацетамидной) «МВТФА» (Pierce Chemical Co., Rockford, IL 61105). Закрывают пробирку и нагревают ее при температуре $70^\circ C$ в течение 15 мин. Ограничен труба может храниться под refri- geration до / MC ГХ-анализ не готов быть выполнена. Незамедли- тельно до анализа, позволяють трубки нагреться до комнатной темпера- тура.

ГХ / MC анализ

Экспериментальные условия для анализа ГХ / MC для methamphe- tamine трифторацетамида заключаются в следующем:

ГХ колонка: 1,8 м x колонка 2 мм (ID), стекла упакованы с 3 процента OV-17 на 100/120 меш Газ Chrom Q (Прикладные науки Лаборатория, State College, PA 16801)

Carrier и газ-реагент: Метан, 15-20 мл / мин

Температура: Инжектор, $260^\circ C$
Колонка, $120^\circ C$, изотермический ГХ / MC
линии передачи, $260^\circ C$ Источник ионов,
 $160^\circ C$

В этих условиях метамфетамина трифторацетамид должен вымывается в течение двух-четырёх минут, как узкий, симметричный пик. До начала ОГО / MC анализа образцов, производительность общей системы ОГО / МСА должна быть оценена и оптимизирована обозначением cribed в главе 2. Ионов, которые будут происходить при отслеживаемых м / г и 246

251. Они соответствуют протонированным ионам молекулы для methamphe- tamine трифторацетамид и methamphetamine-2 ЧАС5 трифторацетамид,

соответственно. С отбракованных клапана в положении отбракованных, вводят от 2 до 6 мкл органического экстракта в газовый хроматограф. Примерно через 1 мин, переключить отбракованный клапан таким образом, что весь поток газа-носителя поступает в источнике ионов масс-спектрометре, и начинают сбор данных. Когда метамфетамин трифтор-ацетамида пика элюирования прекратить сбор данных и вернуть отбракованный клапан в положение отбракованного.

Количество метамfetamina в образце определяется путем измерения высоты (или участков) или **метамфетамин trifluoroacetamide и methamphetamine-2 ЧАС₅ трифторацетамид пика профилей токов** выбраны ионными («ионные хроматограммы») и relat- Инг отношения высот пиков к калибровочной графике. Вычислить концентрацию метамfetamina в образце путем деления измеренного количества метамfetamina точным объемом образца, экстрагированных.

Обсуждение процедуры экспериментальной

Процедура анализа амfetamina (глава 10) практически идентична этой процедуры, за исключением ионов контролируемых. Следовательно, концентрация обоих препаратов может быть измерена од-новременна путем добавления дейтерированных аналогов двух препаратов в био-логического образца для использования в качестве внутренних стандартов. Затем во время сбора данных, ионные токи в четырех значений m/z контролируются. Эти m/z 232, 235, 246, и 251, которые соответствуют про-ионам **топated молекулы для производных амfetamina трифторацетамида, amphetamine-2 ЧАС₃, метамфетамин и methamphetamine-**

2 ЧАС₅, соответственно.

Электронный удар (EI) и химическая ионизация (CI), массы-спектры метамfetamin трифторацетамида показаны на рисунке 1. Относительные чувствительности, достигнутых путем мониторинга ионного тока при значении m/z , соответствующей наиболее распространенного ион, генерируемого каждым из ионизации процессы показаны в таблице 1.

В этом

Случай, самый высокий ответ был получен путем мониторинга ионов фрагмента при m/z 154, генерируемого EI ионизации. Тем не менее, CI должны дать эффективные чувствительности по крайней мере, столь же высоко как EI ионизации быть-причиной нижнего фона обычно испытывали в CI. Наиболее распространенными ионов в масс-спектрах CI соответствуют протонированного молекулярного иона (m/z 246) и аммиак присоединения иона (m/z 263), в зависимости от того, в одиночку метан или метан и аммиак используют в качестве газообразных реагентов. Даже если процедура определяет использование метана отдельно в качестве газа-реагента, сочетание метана и аммиака также является удовлетворительным и должны обеспечивать несколько лучшую чувствительность.

Дополнительный вариант, который можно исследовать, если помехи будут противодействовать ен-в выбранных измерениях мониторинга ионов, является, создали ел производный отличается от трифторацетамида. Для Например, уже производное ацетамида может быть получен путем замены N-ацетилимидазол

для N-метил бис-(трифторацетамид). Также в pentafluoroacetamide или heptafluorobutyramide производные могли

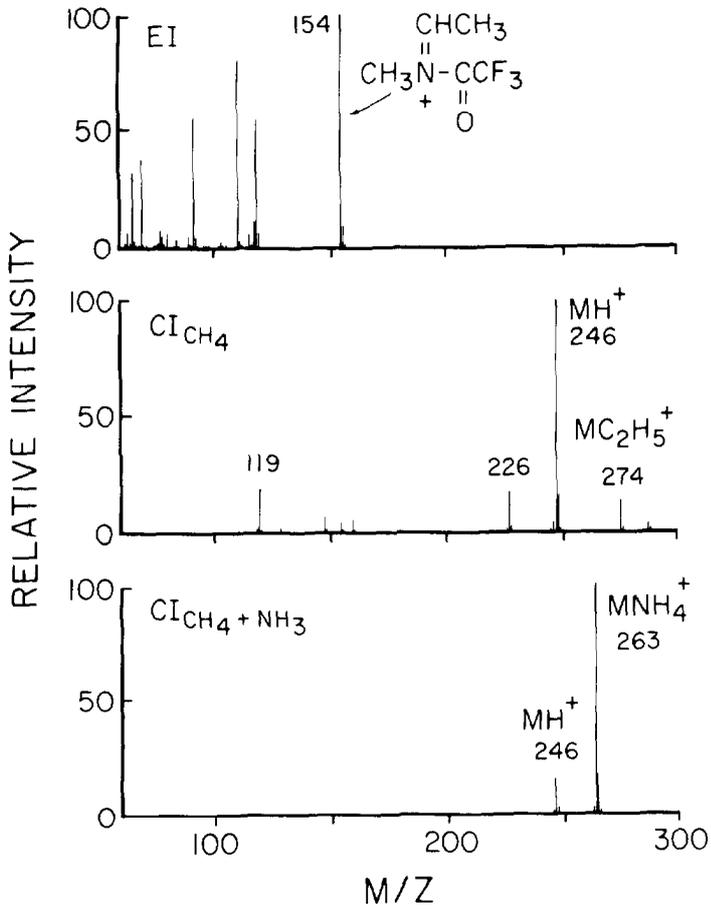


РИСУНОК 1. MASS SPECTRA метамфетамина трифтор-ацетамида

использоваться. Производная трифторацетамида доказал удовлетворительной, но использование других производных не в полной мере оценено.

Таблица 1. Относительная РЕАКЦИЯ ДЛЯ ВЫДАЮЩИХСЯ ИОНОВ В
EI И ДИ масс-спектры трифторацетамид ПРОИЗВОДНОЙ метамфетамина

<u>МЕТОД</u>	<u>м / г Контролируемый</u>	<u>% От Sample Relative Response Per</u> <u>Ion Текущий блок Вес Drug</u>	
EI	154	18	100
ДИ (СН ₄)	264	50	32
ДИ (СН ₄ + Нью-Гемпшир [®])	263	72	59

Потенциальная проблема, связанная с концентрацией органических трактов, содержащих метамфетамин бывших является потерей препарата путем испарения из-за его относительно высокой волатильность. По этой причине, некоторые процедуры метамфетамина анализа указать добавление кислоты для превращения препарата в энергонезависимые соли до концентрации вакана экстракта.

В методике, описанной здесь, потери из-за испарения сведены к минимуму с помощью следующих средств. Во-первых, метилхлорид используется в окончательной экстракции, поскольку он имеет более низкую температуру кипения (39 ° С), чем 1-хлорбутана (78 ° С). Во-вторых, метамфетамин превращают в менее летучего трифтор ацетамида производное перед удалением растворителя. Наконец, небольшое количество диметилформамида добавляет непосредственно перед евар-огативе концентрации, чтобы действовать в качестве «хранителя растворителя.»

Исследование, проведенное сравнение показало, что все органические растворители, исследованных за исключением диэтилового эфира эффективны в извлечении methamphetamine с 2,5 N гидроксида натрия (таблица 2). 1-хлорбутан был выбран в качестве растворителя для извлечения метамфетамина из биологических жидкостей. Это представляет собой компромисс нескольких факторов, в том числе эффективности экстракции, летучесть растворителя, чистоты экстракта, и легкости отделени органической фазы от биологически жидкости. Диэтиловый эфир, этилацетат, хлористый этилен и были исключены из рассмотрения из-за их относительно низких коэффициентов распределения (4,3, 25,8 и 41,9, соответственно). Хлор-форма: isorexanол 9: 1 (об / об), хлороформ, хлористый метилен и все имели высокий коэффициент распределения (82,8, > 90 и 78,5, соответственно), но они образуют нижний слой водной / органической двухфазной СИСТЕМЫ, и поэтому трудно отделить их от жидкостей организма с помощью пипетки без введения загрязнения из водной фазы. 1-хлорбутан, гексан, циклогексан и все они имеют относительно высокие коэффициенты распределения (70,3, 81,3 и 74,3, соответственно), и все образуют верхний слой водного / органического двухфазной СИСТЕМЫ. Из них гексан было найдено, чтобы вызвать проблемы и эмульсии

был исключен из дальнейшего рассмотрения. Несмотря на то, 1-хлоробу- Тане и циклогексан имеют аналогичные коэффициенты распределения, 1-хлор- бутан был выбран для экстракции метамфетамина на основе предварительно самоочевидный успешного опыт с помощью этого растворителя для экстракции лекарственного средства.

При pH 10, процент метамфетамина, извлеченный из водного раствора достигает максимальные (около 97 процентов), и это существенно не изменяется при более высокой области рНа.

Таблица 2. ПЕРЕГОРОДОЧНЫХ КОЭФФИЦИЕНТЫ метамфетамина
От 2,5 до гидроксида натрия и различных органических растворителей (а)

<u>Органический растворитель</u>	<u>раздел Коэффициент</u>	<u>Процент метамфетамин в органической фазе</u>
Диэтиловый эфир	4,3	81,1
Этилацетат	25. 8	96,3
Хлороформ: Изопропиловый 9: 1 (об / об)	82,8	98,8
Метиленхлорид Хлороформ	78,5	98,7
	90	100
Этилен Chloride	41,9	97,7
1-хлорбутан	70,3	98,6
гексан	81,3	98,8
циклогексан	74,3	98,7

(А) равные объемы 2,5 N гидроксида натрия и органической фазы
были использованы для определения коэффициента распределения.

Физические, химические и спектрометрических данных метамфетамина

Номенклатура

Химическое название: Д,Н., -Dinitrophenethylamine

Эмпирическая формула: C₁₀H₁₅N

Число реестра: _____ d-Methamphetamine: [537-46-2]
d-метамфетамин Hydrochloro- езды: [51-57-0]

Торговые названия: Адипекс, Amphedroxyn, Desfedrin, Desoxyfed, Desoxyn, Destim, Dexoxal, Doxephin, Drinalfa, Efxoxine, Gerobit, Hiropon, Isophen, Madrine, Methedrine, Methylisomyn, первитин, Semoxydrine, Soxysympamine, Syndrox, Tonedron

Физические константы

Температуры плавления: _____ d-метамфетамин гидрохлорид: 173-175 & deg; C

Удельное вращение: d-метамфетамин $[\alpha]_D^{25} = +14^\circ \text{ до } +20^\circ \text{ (C = 1)}$

Растворимость г-Methamphetamine гидрохлорид: _____ 1 г / 2 мл воды,
1 г / 3 мл этанола, 1 г / 5 мл Хлороформ

Acid константа диссоциации: _____ d-метамфетамин гидрохлорид pKa =
9,89

Показатель преломления: d-метамфетамин гидрохлорид $(n_D^{25}) = 1,5101$

Точка кипения: D-метамфетамин 212 ° C

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. А. Огата. J. Pharm. Soc. Япония, 451, 751 (1919). _____
2. Т.Хейли. Варенье. Pharm. Assn., 36, 161 (1947). _____
3. М. Лампа. Наркотики: Информация для кризисного лечения. STASH Press, Beloit, WI (1972).
4. J.C. Гэрриот и F.G. Spruill. Дж судебной Sci., 18, 434 (1973). _____
5. М.Д. Соломон и J.A. Райт. Clin. Chem., 23, 1504 (1977). _____
6. Г. Feuer, Д. Миллер, S.D. Купер, Ф. де ла Iglesia и Г. Ламб. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther., И Toxicol., 7, 13 (1973). _____

7. CD Морган, Ф. Cattabeni и Е. Коста. J. Pharmacol. Exp. Ther., 180, 127 (1972). _____

8. J. Caldwell, LG Дринг и RT Williams. Biochem. J., _____
129, 11 (1972).
9. ТВ Ври, ТJM Muskens и JM Ван Россум. Архипелаг Int. Pharmacodynamie, 199, 311 (1972). _____

10. Н. Thoenen, А. Hürlimann, KF Г'Ёй и W. Haefely. Life Sci., _____
5, 1715 (1966).
11. АН Беккет и М. Kowland. J. Pharm. Pharmacol., 17, _____ .. 109S (1965). _____
12. МС Каравуа, М. А. Эль-Кеiy, СК Вахб и AP Козман.
J. Pharm. Pharmacol., 20, 650 (1968), _____
13. JE Уоллес, JD Биггс и SL Лэдд. Анальный. Chem., 40, 2207 (1968). _____
14. J. Monforte, RJ Ванна и I. Саншайн. Clin. Chem., 18, 1329 (1972). _____
15. RN Гупта, BG Киттимских и PM Кеане. J. Chromatogr. Sci., 12, 67 (1974). _____

16. RB Брюс и WR Маупард, младший Anal. Chem., 41, 977 (1969). _____
17. RC Дрисколл, FS Барр, ВJ Gragg и GW Мур. J. Pharm. Sci., 60, 1492 (1971). _____
18. JW Швейцер и AJ Friedhoff. Clin. Chem., 16, 786 (1970). _____
19. П. Lebish, BS Finkle и JW Brackett, младший Clin. Chem.
16, 195 (1970). _____
20. NC Jain, TC Снит и RD Бадд. Clin. Chem., 20, 1460 (1974). _____
21. NC Jain, RD Бадд и TC Снит. Clin. Toxicol., 8, 211 (1975). _____
22. К. Камяя, М. Murata, К. Ишие, М. Namekata, и А. Momose. Химреагент Pharm. Bull., 21, 1996
(1973). _____
23. АН Беккет, GT Такер и AC Моффат. J. Pharm. Pharmacol., 19, 273 (1967). _____

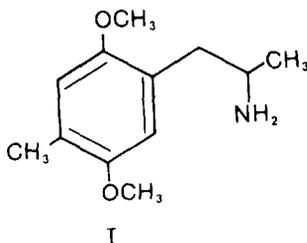
24. А. В. Clin. Toxicol., 8, 225 (1975). _____
25. GJ Pìggorio и EK Kniаз. Наркотическая и алкогольная зависимость, _____
1, 377 (1976).

26. Abuscreen. Roche Diagnostics, Натли, штат Нью-Джерси 07110.
27. EMIT. Syva, Palo Alto, CA 94304.
28. JW Blake, RS Ray, JS Нунан и PW Murdick. Анальный. Chem., 46, 288 (1974). _____

29. BJ Gudzinowicz и МДж Gudzinowicz. Анализ средств и метаболитов с помощью газовой _____
хроматографии - масс-спектрометрии, Vol. 4. Marcel Dekker, Inc., New York (1978). _____
30. А. Ф. Фентимэн, младший и RL Фольц. J. меченых соединений и радиофармпрепаратов, 12, 69
(1976). _____

2, 5-диметокси-4-метамфетамин (DOM),

В конце 1960-х годов улица наркотиков известна пользователям как «СТР» был экс обостренно распространен в Соединенных Штатах как галлюциноген (1). Психотомиметическое компонент запрещенных препаратов был тально, как 1- (2,5-диметокси-4-метилфенил) -2-аминопропан (I), в структуре более удобно упоминается как 2,5-диметокси-4-метил- амфетамин или DOM, который был разработан в качестве экспериментального соединения по Dow Chemical Company. Ранние испытания его психотропной активности у мышей показали, поведенческие реакции, очень похожие на те, вызываемые мескалин, но требуется лишь около одной пятидесятью дозы для эквивалентного ответа (2). Контролируемые лекарственные исследования на добровольцах показали галлюциногенную активность в 100 раз больше, чем мескалин, но только около одной тридцатой, что ЛСДА. Действие препарата включали повышение частоты пульса, систолическое артериальное давление и температура, а также тошнота, парестезии, тремор и. Психоактивность началась с умеренной эйфорией в течение 1-2 ч после приема всего 2 мг; а дозы свыше 5 мг всегда производимых отмечены галлюциногенные эффекты интенсивности от дозы, которая утихла в течение 8 ч (1).



Чувствительные и галлюциногенные эффекты DOM ограничены R - (-) энантиомер (3).

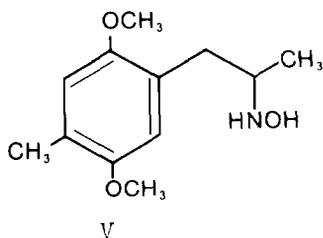
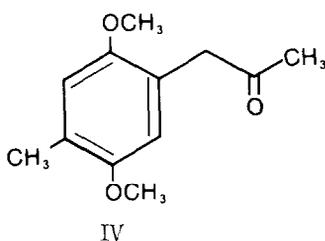
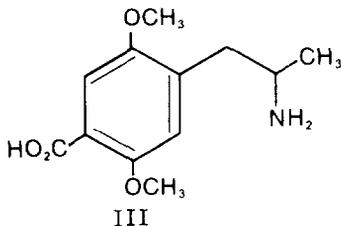
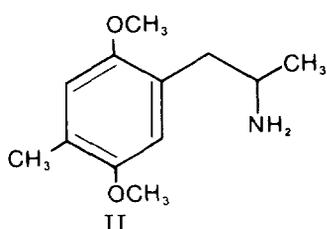
В естественных условиях метаболизма DOM у кроликов является ste-

geoselective (4), а также в печени кролика препараты S - (+) - dom-2 ЧАС

метаболируется быстрее, чем R - (-) - DOM с помощью микросомальных ферментов (5). Несколько метоксильных группы и метильные аналоги были подготовлены для изучения сравнительной фармакологической активности на мышах. Эти stu- матриц показали, что DOM, было почти таким же эффективным, как амфетамин в уменьшении пентобарбитала-индуцированное времени сна, а также о том, что 4-метильной группа, по-видимому, необходима для психотомиметической активности DOM в то время как группа 2-метоксильной не была (6). не DOM имеет никакого известного терапевтическую ценность, но было использовано для научных исследований, касающихся модель психоза.

Метаболизм и фармакокинетики

В естественных условиях исследования на крысах, с использованием радиоактивно меченных трассеры, показали, что основной путь метаболизма POM в том, что видов гидрохлорида из 4-метильной группы к 1- (2,5-диметокси-4-фенил hydrothyl)- 2- аминопропан (II), с последующим окислением II с 1- (2, 5-диметокси-4-карбоксифенил) -2-аминопропана (III). Почти 50 процентов пер- мочевыделительной радиоактивности присутствовал в качестве II плюс его Glu- sionide и сульфат конъюгатов. Без изменений DOM, составила 8 процентов радиоактивности в моче и III, составила 28 процентов. 1- (2,5-диметокси-4-метилфенил) -2-пропанола (IV), был обнаружен в следовых количествах. В кале, 83 процента радиоактивности был обусловлен III; 6 процентов было обусловлено II; только следовое количество было связано с неизменным DOM (7). Идентификация метаболитов была основана на сравнении значений Rf ТОГО с тем, синтезированными стандартами (8). Те же метаболические пути для DOM, в том числе с участием одного незначительного окислительное дезаминирование, были продемонстрированы у кроликов в естественных условиях (4). N-гидроксилирование (V), и O-деметилирования реакции были зарегистрированы в препаратах микросом печени кролика *in-situ* замораживанием с DOM (9). O-деметилируют производное DOM может представлять интерес в свете предположения, что бис-O-деметилируют мнe- tabolite может быть окислен до соответствующего п-гидрохинон, который в свою очередь может циклизиции с образованием 5-гидрокси-2,6-диметилиндол по способу, аналогичному тому, что наблюдалось в течение 6-гидроксидопамина. 5-гидрокси-2,6-диметилиндолы были предложены в качестве возможной причины галлюциногенной активности (10). N-гидроксилирование (V), и O-деметилирования реакции были зарегистрированы в препаратах микросом печени кролика *in-situ* замораживанием с DOM (9). O-деметилируют производное DOM может представлять интерес в свете предположения, что бис-O-деметилируют мнe- tabolite может быть окислен до соответствующего п-гидрохинон, который в свою очередь может циклизиции с образованием 5-гидрокси-2,6-диметилиндол по способу, аналогичному тому, что наблюдалось в течение 6-гидроксидопамина. 5-гидрокси-2,6-диметилиндолы были предложены в качестве возможной причины галлюциногенной активности (10). 6-диметилиндол способом, аналогичным тому, что наблюдалось в течение 6-гидроксидопамина. 5-гидрокси-2,6-диметилиндолы были предложены в качестве возможной причины галлюциногенной активности (10). 6-диметилиндол способом



В человеческом исследовании упоминалось ранее, около 20 процентов от введенной дозы появились в моче в течение 24 часов, как неизменные наркотики. Пик экскреции, между 3 и 6 ч после того, как ад-раздаванием, соответствует пику клинических эффектов (1). У крыс, выведение меченного DOM и его метаболитов было почти завершено в течение 24 часов (7). Концентрация в плазме ПОМА контролировала в течение периода 24-ч в двух 9-кг собак, получавших 2 мг и 4 мг DOM, соответственно, предложила двухфазный процесс ликвидации, с начальным быстрым уменьшением и медленная фазой, соответствующий периодом полураспада 1,5 ч (11).

АНАЛИТИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА

Несмотря на то, DOM был признан наркотиком, по крайней мере, десять лет, мало усилий, по-видимому, было посвящено развитие конфликтной методов идентификации и количественного определения препарата в биологических средах для судебной-медицинских и исследовательских целей. В 1968 году несколько авторов представили данные о физических и химических характеристиках для DOM, в том числе его значения ТСХ Rf и его ультрафиолетового, инфракрасного, ядерного магнитного резонанса и масс-спектров. Эти аналитические методы были использованы для идентификации лекарственного средства в конфискованных запрещенных препаратов (2,12). Ультрафиолетовый спектрофотометрический метод определения DOM после окисления с помощью сульфата церия был сообщен (13). Тем не менее, УФ и ИК-спектры были неудовлетворительными для образцов, содержащих примеси из-за специфичности неадекватны.

Флуориметрический метод был использован для анализа неизмененного DOM в моче человека добровольцев при изучении галлюциногенных реакций (1). Совсем недавно было сообщено высокочувствительным радиоиммунным анализом (РИА), в котором радиоактивным иодом деривативы ПОМ использовали в качестве тест-антигена. Специфичность антитела, выращенного в кроликах с помощью DOM, конъюгированного с сывороточным альбумином человека, была такова, что структурно родственные молекулы (то есть, AM-phetamine, мескалин, катехоламины метаболиты, или N,N-диэтил-триптамин) была несколько порядков меньше, эффективный, чем DOM в качестве ингибиторов (15).

В естественных условиях метаболических исследований на крысах измеряли экскреции тритий-меченных DOM и его метаболиты в моче и в гомогенат фекальных помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика. Метаболиты экстрагируют диэтиловым эфиром и идентифицировали путем сравнения значений Rf ТСХ с тем, синтезированных стандартов. Основные метаболиты были дополнительно характеризуется с помощью газовой хроматографии с пламенно-ионизационного детектора Тион (GC-FID) по колонкам 3 процента OV-1 или 3 процента SE-30 поддерживается при температуре 160 ° C. Количественный анализ отдельных метаболитов было сделано с помощью сцинтилляционного счетчика соответствующих пятен, вырезанных из бумаги хроматограмм (7). Аналогичным образом, концентрации иго-ни капли ПОМ и метаболиты от кроликов приема углерода-14 помечены DOM были измерены с помощью анализа изотопного разбавления при изучении стереоселективного метаболизма.

В пробирке исследования стереоселективного метаболизма использовали direct- зонд химической ионизации масс-спектрометрии с дейтерий-меченных DOM в качестве внутреннего стандарта для количественного определения DOM и его мета- bolites в препаратах печени кролика (5). В других метаболических исследованиях с микросомами печени кролика, методика выбранного мониторинга ионов **была использована для измерения образования DOM метаболита, с dom-2 ЧАС₆ в качестве субстрата, и синтетический N-гидроксилированного метаболита DOM в качестве внутреннего стандарта.** Deuteratcd метаболит про- наведенный с помощью ферментной системы был идентифицирован как его бис- (трифтор-ацетил) производный с помощью ОГО / MCA. Масс-спектры электронного удара были получены после разделения GC на 2 процента Dexil 300 колонки, поддерживаемой при температуре 160 ° C. GC разделения перед изобутана масс-спектрометрии с химической ионизацией были сделаны на 3 процента OV-25 или 3 процента OV-1 столбцов (9).

В опубликованных исследованиях, в которых участвовало извлечение DOM из biolog- ческих образцов, экстракция растворитель обычно был диэтиловым эфиром, без эффективности экстракции сообщенной (4,7).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОЦЕДУРА

Процедура экстракции, дериватизации и Тион GX / MC количественными из DOM является такой же, как описано для анализа мет- амфетамина (глава 9) и другими лекарственными средствами phenylalkylamine (то есть, амфетамина и мескалина). После добавления дейтерий-меченных внутреннего стандарта, образец сделан сильно основной с насы щенного раствором карбоната калия и экстрагировали 1-chlorobu- Тане. DOM и другие органические основания дуги обратно экстрагировали в ди- лютневой серной кислоты, которую затем подщелачивают с помощью гидроксида натрия и повторно экстрагируют с помощью 1-хлорбутана. Органический экстракт затем обрабатывает ангидрид трифторуксусной кислоты, чтобы преобразовать DOM в его N-трифторацетамид производных до концентрации от евар- речи. Количественное достигается за счет выбранного иона мониторинга с использованием химической ионизации с метаном в качестве газа-реагента.

Стандарты и реагенты

DOM • HCl используется в проверке этой процедуры был получен из Национального института по борьбе со злоупотреблением наркотических средств. Он имел температуру плавления 187-189 ° C. DOM • HCl можно приобрести у Applied Science Laboratories, State College, PA 16801. dom-2 ЧАС₆ • HCl, был синтезирован в Battelle Columbus Laboratories с использованием процедуры, опубликованной (15). На основании **масс-спектрального анализа dom-2 ЧАС₆ имел последовавшие изотопный состав: 2 ЧАС₆ 96,1 процента; 2 ЧАС₅, 3,1 процента; 2 ЧАС₄,**

0,6 процента; 2 ЧАС₃, 0,2 процента; 2 ЧАС₂, 2 ЧАС₁, а также 2 ЧАС₀, < 0,1 процента. Для подготовки калибровочных графиков и рабочих стандартов, маточные растворы DOM и dom-2 ЧАС₆ получают следующим образом.

Взвешивание в 100-мл мерную колбу около 11,7 мг DOM • HCl и записывают его вес с точностью до 0,1 мг.

Эквивалентная масса свободного основания вычисляется путем умножения веса DOM • HCl по 0,85.

Растворите измеренный DOM примерно 75 мл метанола, а затем добавить дополнительный метанол, получая ровно 100 мл раствора. В следующих параграфах это решение будет именоваться как «0.10- мг / мл исходного раствора», хотя оно должно быть меченным его фактическое

Концентрация на основании точного измеренного веса DOM hydrochloride. Серия рабочих стандартных растворов могут быть получены путем соответствующего разбавления этого раствора, как описано в Chapter 2.

Исходный раствор dom-2 ЧАС₆ получают таким же образом. Для измерения DOM в жидкостях тела в диапазоне концентраций от 1 до 500 нг / мл, добавление приблизительно 40 нг меж- конечного стандарта каждый мл образца является удовлетворительным. Это может быть удобно сделать путем добавления 100 мкл 400-нг / мл dom-2 ЧАС₆ метанол-IC решение каждый мл образца. Подготовьте / мл внутри- NAL стандартного раствора 400 нг путем разбавления 1 мл 0,10 мг / мл исходного раствора dom-2 ЧАС₆ до 250 мл метанола.

Хранить запас и стандартные растворы в хорошо закупоренных или заблокированных стеклянных сосудах в темноте при температуре ниже 0 ° C.

экстракция

Передача 1 мл жидкости тела (цельной крови, плазмы или мочи) в 20-мл пробирку, снабженную тефлоновой футеровкой винтовой крышкой (от 0,5 до 2 мл образца может быть использован, но оно **должно быть точно измерено**). **Добавьте 100 мкл 400-нг / мл DOM₂ ЧАС₆ раствора и вихревые в течение примерно 10 сек.** Разрешить образец для уравнивания в течение примерно 15 мин, а затем **увеличить pH до более 10 путем добавления 1 мл K₂ Колорадо-3. Насыщались дистиллированной воды.** Извлечение основной смеси с 5 мл l- хлорбутана путем осторожного перемешивания содержимого в течение 30 мин с использованием motorized качалки или ротатора. Центрифуга в течение 5 мин, а затем передать органическую фазу (сверху) на другой 20-мл пробирку с помощью одноразовой пипетки Пастера. Извлечение DOM и другие органические основания из органической фазы в водную кислоту путем добавления 3 мл

0,2 NH₂ TAK₄ и осторожное перемешивание в течение по крайней мере 15 мин. Центрифуга и удалить верхнюю органическую фазу путем аспирации. Добавить 0,5 мл 10 N NaOH к водной фазе, перемешать содержимое и проверить pH, чтобы убедиться, раствор сильно щелочной (pH > 10). И, наконец, **схextract органические основани** из водного щелочного раствора путем добавления 5 мл метилхлорида и осторожно перемешивания в течение по крайней мере 15 мин. Центрифуга в течение 5 мин, Аспирируйте от верхнего водного слоя, и передачи с помощью одноразовой пипетки Пастера Экстракт хлористого метилена (нижний слой) к силилированному концентратора трубки, имеющей объем по меньшей мере, 5 мл, коническим дном и тефлоновым - подкладка винтовой крышки. **Добавьте 10 мкл диметилформамида, чтобы действовать в качестве «хранителя растворителя», чтобы свести к минимуму испарительного потери DOM.** Удалите метилхлорид выпаривания при слабом токе азота или отфильтрованного воздухом при нагревании трубки не выше 40 ° C. Когда объем экстракта уменьшилось до приблизительно 10 мкл, добавляю 15 мкл N-метил-бис (трифторацетамид) «MBTFA» (Pierce Chemical Co., Rockford, IL 61105). Закрывают пробирку и нагревают ее до 70 ° C в течение 15 мин. Ограничен труба может храниться под охлажде- до Ц И А Ц / MC GX-анализ не готов быть выполнена. Незамедли- тельно до анализа, позволяют трубки нагреться до комнатной темпера- тура. Ограничен труба может храниться под охлажде- до Ц И А Ц / MC GX-анализ не готов быть выполнена. Незамедли- тельно до анализа, позволяют трубки нагреться до комнатной темпера- тура. Ограничен труба может храниться под охлажде- до Ц И А Ц / MC GX-анализ не готов быть выполнена. Незамедли- тельно до анализа, позволяют трубки нагреться до комнатной темпера- тура.

Экспериментальные условия для анализа ГХ / МС для DOM trifluoroacetamide заключаются в следующем:

ГХ колонка: 1,8 м х колонка 2 мм (ID), стекла упакованы с 3 процента OV-17 на 100/120 меш Газ Chrom Q (Прикладные науки лаборатория, State College, PA 16801)

Carrier и газ-реагент: Метан, 15-20 мл / мин

Температура: Инжектор, 260 ° C
Колонка, 165 ° C, изотермический ГХ / МС
линии передачи, 260 ° C Источник ионов,
160 ° C

В этих условиях DOM-трифторацетамид должны элюировать при температуре около 4 мин в виде узкого, симметричный пик.

До начала ОГО / МС анализа образцов, производительность общей системы ОГО / МСА должна быть оценена и оптимизирована обозначением *сited* в главе 2. Ионов, которые будут происходить при отслеживаемых m/z 306 и 312. Они соответствуют к протонированные ионы молекулы для DOM трифторацетамид и m/z 208 трифторацетамид соответственно. С отбракованных клапана в положении отбракованных, вводят от 2 до 6 мкл органического экстракта в газовый хроматограф. Примерно через 1 мин, переключить отбракованных клапан таким образом, что весь поток газа-носителя поступает в источник ионов масс-спектрометра, и начинают данные Ac-quisition. Когда пик трифторацетамид DOM имеет элюируют, прекратить сбор данных и вернуть отбракованный клапан в положение отбракованного.

Количество DOM в образце определяется путем измерения высоты (или области) или DOM. трифторацетамид и m/z 208 три- fluoroacetamide пики в текущих профилей выбран ион («ионные хроматограммы») и касающихся соотношения высот пиков на графике calibration. Вычислить концентрацию POM в образце путем деления измеренного количества DOM с помощью точного объема образца, экстрагированных.

Обсуждение процедуры экспериментальной

Ионизационной масс-спектр химической метана в trifluoroacetamide производного *tamide* из DOM показана на рисунке 1. В добавок к протонированный ион молекулы при m/z 306, есть также обильный Фрагментар Ment ион (m/z 193), который образуется в результате потери $H_2 NCOF_3$ от протонированного молекулярного иона. Эти ионы перемещаются в m/z 312 и 199 в масс-спектре CI метана из m/z 208. Обычно только ионные токи при m/z 306 и 312 контролируют в ходе анализа ГХ / МС, но ионные токи при m/z 193 и 199 также можно контролировать, если дополнительная специфичность желательно. Наклон калибровочного графика, полученный путем измерения Z 193/199 соотношения m для образцов, содержащий известные концентрации DOM и m/z 208 может слегка отличаться

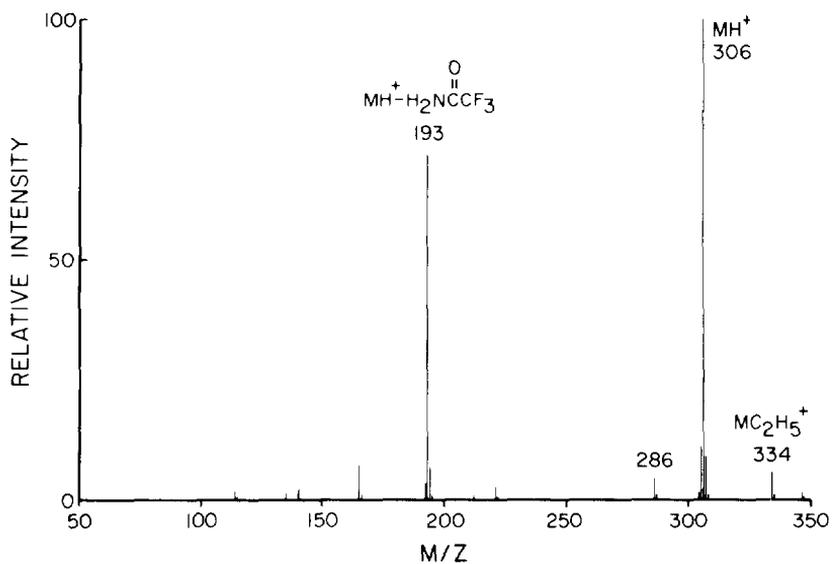


Рисунок 1. МЕТАН ДИ масс-спектр трифтор-
Ацетамид Производная DOM

из наклона полученного для / г 306/312 отношения м. Однако, если концентрация DOM вычисляется из м / г 193/199, отношение высоты пики существенно отличается от концентрации на основе / г 306/312 отношения высоты пики измеряются м, вполне вероятно, что мешающее соединение вносит свой вклад в одном или более пиков DOM • TFA в текущих профилях ионов. Когда это происходит, как правило, визуальный осмотр профилей тока ионов будет раскрывать, какие из высот пиков является неточным из-за помехи;

т.е. пик будет иметь плечо, или будет заметно уширен, или будет иметь ненормальное время удерживания.

Физические, химические и спектрометрические данные для DOM

Номенклатура

Химическое название: 2,5-диметокси-4-метамфетамин

Эмпирическая формула: C₁₂ H₁₆ N₂

Chemical Abstracts Registry Number: _____ 15588-95-1

Физические константы

Внешний вид: белые кристаллы Температура

плавления: 61 °C _____

Гидрохлорид, 190 & deg; C

Удельное вращение: синтетический материал, как правило, рацемический

Растворимость: растворим в воде, растворим в хлороформе

W Поглощение: _____ $\lambda_{max} = 214, 225 \text{ и } 288 \text{ нм}$ (в разбавленной HCl)

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. SN Снайдер, Л. Faillace, Л. Холлистер. Наука, 158, 669 (1967). _____
2. GF Phillips и RJ Mesley. J. Pharm. Pharmacol., 21, 9 (1969). _____
3. AT Шульгина. J. Pharm. Pharmacol., 25, 271 (1973). _____
4. С. Б. Матин, П. С. Callery, И. С. Zwiag, А. О'Брайен, Р. Рапопорт, Н. Кастаньоли, младший, J. Med. Chem., 17, 877 (1974). _____
5. KJ Weinkam, П. Callery, J. Gal, Н. Кастаньоли, младший двадцать второй Ann. Conf. MS и родственная тема, Филадельфия. Abst., Стр. 174 мая 19-24, 1974. _____
6. BT Ho, WM Mclsaac, R. An, LW Тансей, KE Walker, LF Englert, младший, и MB Noel. J. Med. Chem., 13, 26 (1970). _____
7. BT Ho, В. Эстевес, Л. Тансей, LF Englert, PJ Creaven и WM Mclsaac. J. Med. Chem., 14, 158 (1971). _____
8. BT Ho и LW Тансей. J. Med. Chem., 14, 156 (1971). _____
9. J. Гал, Л. Д. Gruenke, и Н. Кастаньоли, младший, J. Med. Chem. 18, 683 (1975). _____
10. И. С. Цвейг и Н. Кастаньоли, младший J. Med. Chem., 17, 747 (1974). _____

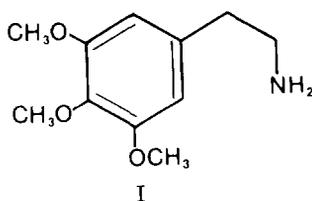
11. RJ Martin и TG Александр. J. Assoc. Выкл. Анальный. Chem. _____
51, 159 (1968).
12. JF Уоллес, JD Биггс и SL Лэдд. Анальный. Chem., 40, 2207 (1968). _____
13. SW Беллмана. J. Assoc. Выкл. Анальный. Chem., 51, 164 (1968). _____
14. LJ Riceberg, X. ван Vunakis, и Л. Левин. Анальный. Biochem., _____
60, 551 (1974).
15. А. Ф. Фентимэн, младший и RL Фольц. J. меченых соединений и радиофармпрепаратов, 12, 69
(1976). _____

Мескалин

Мескалин (3,4,5-trimethoxyphenylethylamine, I) является галлюциногенная составляющей пейот кактус *Lophophora williamsii*, растение, которое использовалось индейцами на севере Мексики с самого раннего времени записи в качестве дополнения к религиозным обрядам, чтобы облегчить голод и усталость, а также для лечения заболеваний (1). В

1889, настойка из пейота появилась в каталоге Parke-Davis как сердечный и дыхательной стимулятор для лечения стенокардии и пневмоторакса. Мескалин впервые был выделен из пейота в 1896 году, но полный синтез пока не сообщалось до тех пор,

1918. В течение 1940-х мескалина был один из нескольких галлюциногенов, используемых в исследованиях, касающихся «модель» психозы (1). В настоящее время использование мескалин, за исключением того, в религиозном контексте некоторыми североамериканскими индейцами, в первую очередь, как незаконный галлюциноген. Тем не менее, уличные наркотики продаются как мескалин, часто содержат мало или ни один из препарата. Вместо этого они могут содержать амфетамины, DOM, белладонны alkaloids, ЛСД или фенциклидин (PCP) в качестве активного ингредиента.

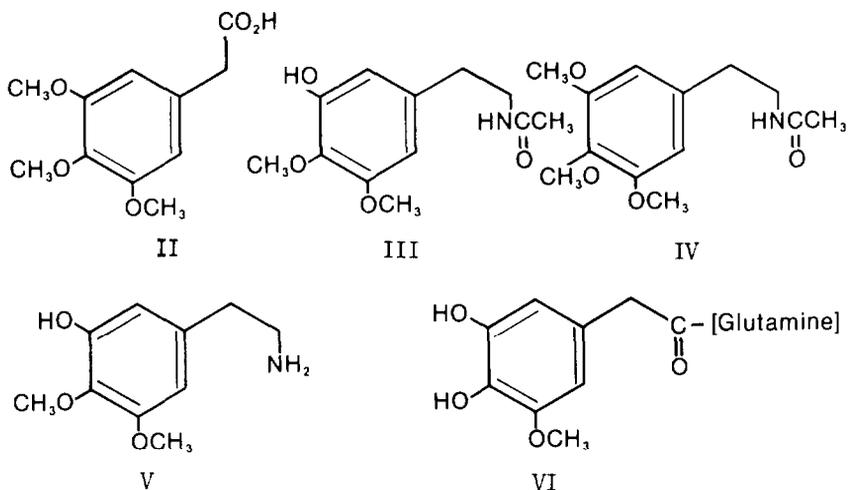


Мескалин, в отличие от большинства других галлюциногенов, которые являются соединения индола, химически related к нейромедиаторов, гормонов эпинефрина и норэпинефрина. Фармакологические эффекты изменяются среди видов животных. Физическая зависимость не была продемонстрирована в человеке, хотя повторные дозы толерантности мескалин вызывает к физиологическим, субъективным и психологическим эффектам препарата, в течение 3-х до 6 дней. Крест толерантность к этим эффектам было продемонстрировано между мескалин и ЛСД или псилоцибина. Некоторые лекарства, такие как инсулин и барбитураты, потенцировать токсичность мескалина. отравление Мескалина может вызвать спазмы в животе, тошноту, vomit-ING, и другие симптомы, которые могут быть ошибочно принимают за острый gastroenteritis, аппендицит, или панкреатит (2). Галлюциноген мескалин доза составляет около 500-1500 мг (1).¹⁴ С в мозге кошек показали самую высокую концентрацию радиоактивности в корковом и подкорковом сером веществе (3). В ментах с овечьим пупочным сосудистой пробиркой эксперимент (4) и в естественных условиях исследования реакций у крыс (5) показал, что антагонисты серотонина также antagonize действия мескалина, что подтверждает гипотезу о том, что меска-

Линия инициирует свою фармакологическую активность через рецепторы серотонина. Попытки синтезировать специфические антагонисты мескалина привели к получению N-аллил, и N-н-пропил-производных мескалин, которые в одиночку не оказывают никакого влияния на поведение крошки лабиринте мышей, но делают антагонистическое действие мескалин на поведение мыши. Нет корреляция не была продемонстрирована, однако, между переплыв лабиринте эф- фектов мескалина у мышей и психотомиметической потенции у людей (6).

Метаболизм и фармакокинетики

Мескалин метаболизм был изучен в нескольких видах, стимулируется доказательством того, что галлюциногенные свойства мескалина являются Дей- ствительно, вызванное одним или несколькими из его метаболитов. Об этом свидетельствует, потому что психотомиметические эффекты, как правило, занимают несколько часов, чтобы достичь своего максимума и галлюциногенная доза настолько велика. Случаи «ретроспективных кадров» в течение периода нескольких месяцев после однократной дозы мескалина также сообщалось (7). Основной мочевыделительной продукт метаболизма у млекопитающих 3,4,5-trimethoxyphenylacetic кислоты (II), получают путем окислительного дезаминирования путем соответствующего альдегида. Альдегида также может быть сведена к 3,4,5-trimethoxyetha- ноле, который был обнаружен в моче и мозге крыс, хотя альдегид промежуточного соединения самого по себе не был выделен (8). Фермент, участвующий в дезаминирования отличается от моноаминоксидазы в том, что это цианистое чувствительном и устойчивой к октанолу, и она была характеризоваться как тип-II фермент (диаминоксидазы) (9,10). Однако, мескалин не метаболизируется в человеке или в лабораторных животных. Метаболические исследования с mescaline- ¹⁴ C у человека показали, что 55-60 процентов препарата из организма без изменений в моче. Trimethoxyphenylacetic кислоты составила 27-30 процентов радиоактивности в моче, в то время как N-ацетил-SS- (3,4-диметокси-5-гидроксифенил) этиламина (III) в виде конъюгата, представленное на 5 процентов и N-acetylmescaline (IV) менее 1 процента. Пропорции изменяются со временем после введения. Пять других незначительных мета- bolites были только частично охарактеризованы (11). Другие исследования показали наличие 3,4-диметокси-5-hydroxyphenethylamine (V) и глутамин конъюгата 3,4-дигидрокси-5-метоксифенилуксусной кислоты (VI) в моче человека после введения мескалина (7,12). Соединения I, II, III и IV были также обнаружены в спинномозговой жидкости (CSF человека) после перорального введения mescaline- ¹⁴ C. Мескалин представлены по меньшей мере, 50 процентов CSF радиоактивности, а концентрация радиоактивности в CSF-видимому, совпадает с пиком поведенческих проявлений. Средняя биологическая полураспада радиоактивности проглоченной, как мескалин в этом исследовании была 6 ч, с 87 процентами от дозы выводится из организма в течение 24 ч и 92 процентов в течение 48 часов (11). Ни trimethoxyphenylacetic кислота, ни N-ацетил- мескалин, в дозах до 12 мг / кг, имела какие-либо физиологические и психологические эффекты у человека, что свидетельствует о том, что N-acety- и дезаминирование лямбда-область для детоксикации мескалина. Расхождение в относительном количестве trimethoxyphenyl- уксусной кислоты и N-acetylmescaline в CSF по сравнению с мочой, что наводит на ложил в центральной нервной системе N-ацетилирование является более важным путем (11).



ЦНС мышей (13), и крысы, на которых ацетилирование появилось происходить преимущественно в растворимых клеточных фракциях (14). 0-Demethy- ляционной мескалина было сообщено; однако, 0-деметилирования может происходить спонтанно в кислых условиях, что ставит под сомнение подлинность этих метаболитов в моче (12).

В ходе продолжающихся усилий, чтобы определить механизм галлюциногенной активности мескалина, крысы, обученные для дискриминационных ответов были даны ингибиторы альдегиддегидрогеназы или амин оксидазы перед обработкой мескалина или три из своих главных крыс метаболизируемых Lites. Определенная роль в мескалине индуцированных интероцептивных раздражителей не может быть установлена для любого из (8) метаболитов; Однако, в головном мозге мышей, деградации боковой цепи мескалин к 3,4,5-trimethoxyben- Zoic кислоты была продемонстрирована в естественных условиях и в пробирке, катализируемой ферментами в ядерной и микросомальной фракции ткани головного мозга (15). Авторы доклада отмечают, что полное выяснение механизма окислительной деструкции мескалина на 3,4,

АНАЛИТИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА

Тонкослойная хроматография (ТСХ) и газовой хроматографии (ГХ), были методы, используемые в большинстве исследований для изоляции и установле- нию мескалин в биологических жидкостях или растительных материалов (16,17). Для тонкослойной хроматографии, мескалин экстрагируют из мочи может быть разработана в этил

этилацетат: метанол: NH_4OH (85: 5: 5) и опрыскивают нингидрином перед облучением при 350 нм света, или в смеси хлороформ: метанол (9: 1) обрабатывают реагентом Marquis. Предел обнаружения сообщалось ТСМ составляет 40 нг / мл. Условия GC рекомендуемые для подтверждения меска- линии в экстрактах мочи 3 процента SE-30 на хромосорбе W-AW 100/200 меш в алюминиевой колонке покрытой тефлоном, и температура печи 150 & deg; C (2). Недавнее исследование мескалина метаболизма в ткани мозга мышей использовали массы-спектрометрию, чтобы подтвердить идентификацию 3,4,5 триметоксибензойной кислоты в качестве его бромированного производного после TLC отстоящей товки (15). Количественный радиоиммуноанализ, которые могут разли- чать между мескалином и его наиболее распространенным мочевыделительным метаболитом, три- метоксифенилуксусной кислоты, сообщается. Анализ обнаружен как мало, как 100 мкг мескалина (18).

Очень чувствительный метод ГХ / МС для количественного определения мескалин в крови или моче было сообщено (19). Плазму крови подщелачивают (pH 10) и экстрагируют бензолом. Экстрагируют мескалин превращали в его трифторацетил производного, которое было измерено с помощью ГХ / МС с использованием 2,5 процента OV-1 на Varaport колонке упаковки и колонки темпера- тура 195 ° C. Дейтерированный мескалин был использован в качестве внутреннего стан- Dard. Предел обнаружения, как сообщалось, 0,5 нг инъекции на колонке.

Мескалин может быть отделен от его метаболитов в моче кислоты путем экстракции последнего из раствора кислоты с этилацетатом. Салине остается экране телевизора появляется в водной фазе и может быть количественно экс затяжного с бензолом после того, как раствор состоит из сильно основной (11). экстракцию мескалин из мочи при pH 8,5 в н-бутанола также сообщалось, с восстановлением 65 процентов после рекстракции в

0,1 N HCl (20). Там также сообщает извлечения мескалин из мочи забуференного при pH 9,2 с использованием хлороформа или хлороформ: изопропанол (3: 1) (2,3) и дихлорэтана: изоамилового спирта при pH 10 (1 2)

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОЦЕДУРА

Процедура экстракции, дериватизация и GC / MS количественного мескалина является таким же, как описано для анализа мет- амфетамина (глава 11) и других лекарственных средства phenylalkylamine (то есть, амфетамин и DOM). После добавления дейтерий-меченных меж- конечного стандарта, образец сделан сильно основной с помощью насыщенного раствора карбоната поля- калии и экстрагировали 1-хлорбутана. Мескалин и другие органические основания обратно экстрагировали в разбавленную сульфаты fuig кислоты, который затем подщелачивают с помощью гидроксида натрия и повторно экстрагируют с помощью 1-хлорбутана. Органический экстракт затем обрабатывают ангидридом трифторуксусной кислоты, чтобы преобразовать мескалин к его N-трифторацетамидной производное до концентрации путем выпаривания.

Стандарты и реагенты

Гидрохлорид мескалин (т.п. 183-184) и mescaline-2 ЧАС3 гигиеническое drochloride (т.п. 179-182), используемое в проверке этой процедуры было получено из Национального института по борьбе со злоупотреблением наркотических средств. Нет примеси и

связи были обнаружены в обоих соединении с помощью газовой хроматографии. mescaline-2 ЧАС₃ HCl, дополнительно исследовали с помощью тонкослойной хроматографии (силикагель пластин, 1,5 процента аммиака в метаноле, R_f = 0,19) и обнаружили, чтобы дать одно пятно. Три атома дейтерия в saline- экране телевизора появятся 2 ЧАС₃ были расположены на группе 4-метокс.

Его изотопный состав

2 ЧАС₀, < 1 процент. позиция: 2 ЧАС₃, 93 процентов; 2 ЧАС₂, 3 процента; 2 ЧАС₁, 3 процента;

Для подготовки калибровочных графиков и рабочих эталонов растворов мескалина и mescaline-2 ЧАС₃ получают, как следую щим образом. Взвешивание в 100-мл мерную колбу около 11,7 мг гидрохлорида Caline экране телевизора появится и записать его вес с точностью до 0,1 мг. Эквивалентная масса свободного основания вычисляется путем умножения веса мескалина гидрохлорида 0,85. Растворить измеренный мескалин примерно 75 мл метанола, а затем добавить дополнительный метанол, получая ровно 100 мл раствора.

В следующих пунктах

это решение будет именоваться как «0,10 мг / мл исходного раствора», хотя оно должно быть меченным с его фактической концентрацией на основе точного измеренного веса мескалин гидрохлорида. Серия рабочих стандартных растворов могут быть получены путем соответствующего dilu- ции этого раствора, как описано в главе 2.

Исходный раствор mescaline-2 ЧАС₃ получают таким же образом. Для измерения мескалина в жидкостях тела в пределах диапазона концен- трации от 1 до 500 нг / мл, добавление приблизительно 40 нг внутреннего стандарта, чтобы каждые мл образца является удовлетворительным. Это может быть удобно сделать путем добавления 100 мкл / мл мескалин метанольного раствора 400 нг каждый мл образца. Подготовьте / мл раствора внутреннего стандарта 400 нг путем разбавления 1 мл 0,10-нг / мл исходного раствора mescaline-2 ЧАС₃ до 250 мл метанола.

Хранить запас и стандартные растворы в хорошо закупоренных или заблокированных стеклянных сосудов в темноте при температуре ниже 0 ° C.

экстракция

Передача 1 мл жидкости тела (цельной крови, плазмы или мочи) в 20-мл пробирку, снабженную тефлоновой футеровкой винтовой крышкой (от 0,5 до 2 мл образца может быть использован, но оно должно быть точно измерено). Добавьте 100 мкл 400-нг / мл mescaline-2 ЧАС₃ раствора и вихревые в течение примерно 10 сек. Разрешить образец для уравнивания в течение приблизительно 15 мин, а затем In- складки pH до более 10 путем добавления 1 мл K₂ Колорадо- насыщенная дистиллированная вода. Извлечение основной смеси с 5 мл 1-хлор- бутана путем осторожного перемешивания содержимого в течение 30 мин с помощью моторизованной качалки или ротатора. Центрифуга в течение 5 мин, а затем передать орг нической фазы (верхнюю) на другую 20-мл культуральной трубку с помощью дис-posable пипетки Пастера. Извлеките мескалин и другие органические основания из органической фазы в водную кислоту добавления 3 мл 0,2 NH₂ TAK 4 и осторожное перемешивание в течение по крайней мере 15 мин. Центрифуга и вновь перемещать верхнюю органическую фазу путем аспирации. Добавить 0,5 мл 10 N NaOH к водной фазе, перемешать содержимое и проверить pH, чтобы убедиться, раствор сильно щелочной (pH > 10). И, наконец, геex- тракта органических оснований из водного щелочного раствора путем Добавить- 5 мл Ингов метилхлорида и осторожно перемешивание в течение по крайней мере 15 мин.

Центрифуга в течение 5 мин. Аспирируйте от верхнего водного слоя, и передачи с помощью одноразовой пипетки Пастера Экстракт хлористого метилена (нижний слой) к силилированному концентратора трубки, имеющей объем по меньшей мере, 5 мл, коническим дном и тефлоновым - подкладка винтовой крышки. Добавьте 10 мкл диметилформамид, чтобы действовать в качестве «хранителя» растворителя для минимизации испарительного потери мескалина. Удалите метиленхлорид выпаривания при слабом токе азота или отфильтрованного воздухом при нагревании трубки не выше 40 ° С. Когда объем экстракта уменьшилось до приблизительно 10 мкл, добавляют 15 мкл N-метил-бис (трифторацетамид) «MBTFA» (Pierce Chemical Co., Rockford, IL 61105). Закрывают пробирку и нагревают ее при температуре 70 ° С в течение 15 мин. Ограничен труба может храниться в холодильнике до тех пор / МС ГХ-анализ не готов быть выполнена. Незамедлительно перед анализом, позволяя трубке нагреться до комнатной температуры. ГХ / МС анализ

Экспериментальные условия для анализа ГХ / МС для мескалин трифторацетамида заключаются в следующем:

ГХ колонка: 1,8 м x колонка 2 мм (ID), стекла упакованы с 3 процента OV-17 на 100/120 меш Газ Chrom Q (Прикладные науки Лаборатория, State College, PA 16801)

Carrier и
газ-реагент: Метан, 15-20 мл / мин

Температура: Инжектор, 260 ° С
Колонка, 160 ° С, изотермический ГХ / МС
линии передачи, 260 ° С Источник ионов,
160 ° С

В этих условиях, мескалин трифторацетамид должен элюирования при температуре около 4 мин в виде узкого, симметричный пик.

До начала ОГО / МС анализа образцов, производительность общей системы ОГО / МСА должна быть оценена и оптимизирована обозначением *sited* в главе 2. Ионов, которые будут происходить при отслеживаемых м / з 308 и 311. Они соответствуют к протонированная молекула ионов для **Saline трифторацетамида экрана телевизора появится и mescaline-2 ЧАС³ трифторацетамид соответственно. С** отбракованных клапана в положении, отбракованных инжестируется от 2 до 6 мкл органического экстракта в газовый хроматограф. Примерно через 1 мин, переключить отбракованный клапан таким образом, что весь поток газа-носителя поступает в источнике ионов масс-спектрологии метра, и начинают сбор данных. Когда мескалин трифтор- ацетамида пика элюировало, прекратить сбор данных и вернуть отбракованный клапан в положение отбракованного.

Количество мескалина в образце определяется путем измерения высоты (или участков) или мескалин **трифторацетамид и mescaline-2 ЧАС³ трифторацетамид пика профилей токов выбраны ионными («ионные хроматограммы»)** и связанные отношение высот пиков к калибровочной графике. Вычислить концентрацию мескалина в образце пути деления измеренного количества мескалина точного объемом образец, экстрагированный.

Обсуждение процедуры экспериментальной

Ионизационной масс-спектр химической метана в трифтор производного ацетамида мескалина показан на рисунке 1. только в изобилии ионов в масс-спектре является протонированного иона молекулы при m/z 308. **ионный фрагмент, образованный потерей H_2 $NCOCF_3$ от протонированного молекулярного иона** значительно меньше, чем в изобилии находится в масс-спектрах Cl метана из других лекарственных средств, включенных в phenylalkylamine этой монографии. Это, вероятно, потому, что амид азота присоединен к первичный атом углерода, а не вторичного углерода, как это имеет место в амфетамин, **метамфетамин и DOM. Устранение H_2 $NCOCF_3$ из вторичного углерода приведет к более стабильному** иону карбонии.

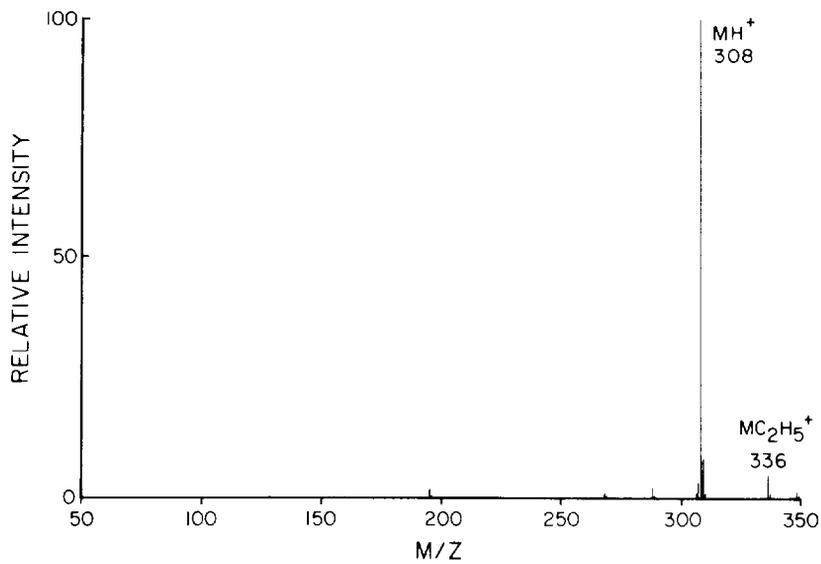


Рисунок 1. МЕТАН ДИ Масс-спектр из: трифтор-
Ацетамид Производная МЕСКАЛИНА

Физические, химические и СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ДАННЫЕ ДЛЯ МЕСКАЛИНА

Номенклатура

Химическое название: 3,4,5-Trimethoxybenzenethanamine или
3,4,5-Trimethoxyphenethylamine

Эмпирическая формула: C₁₁ H₁₇ N O₃

Номер Chemical Abstracts реестра: _____ 54-04-6

Физические константы

Внешний вид: белые кристаллы

Точка плавления: 35-36 ° C
Гидрохлорид, 181 ° C

Точка кипения: 180 ° (12 мм)

Удельное вращение: Оптический неактивны

Растворимость: Умеренно растворим в воде; растворим в спирте, хлороформ, бензол;
практически не растворим в эфире и петролейном эфире

УФ-поглощение: _____ $\lambda_{\text{макс}} = 268$ ($A_1^{1\%} = 30$)

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Сотрудники студенческой ассоциации по изучению галлюциногенов, мескалин и Пейота: обзор литературы. STASH Press, Madison, WI (1974). _____
2. DT Тейтельбаума и DC Wingeleth. J. Anal. Toxicol., 1, 36 (1977). _____
3. H. Neff, G. V. Росси, G. Д. Чейз, и JL Рабинович. J. Pharmacol. Exp. Ther., 144, 1 (1964). _____
4. DC Дайер, P. Benington и RD Morin. Архипелар Int. Фарма содын. Ther., 217, 197 (1975). _____
5. JC Winter. Архипелар Int. Pharmacodyn. Ther., 214, 250 (1975). _____
6. Ф. DeSantis, младший и K. Nieforth. J. Pharm. Sci., 65, 1479 (1976). _____
7. Дж Harley-Мейсон, AH Laird и JR Смитис. Confinia Neurologica, 18, 152 (1958). _____
8. RG Browne и BT Но. Pharmacol. Biochem. и поведение. _____
3, 109 (1975).

9. E. A. Zeller, Дж Барский, Е. Р. Бермана, М. С. Черкас и JR Фонтс. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 124, 282 (1958). _____
10. LJ Riceberg, М. Саймон, Х. Ван Vunakis и RH Абелес. *Biochem. Pharmacol.*, 24, 119 (1975). _____
11. К. Д. Charalamrous, К. Уокер, Дж Кинросс-Райт. *Психотехническая pharmacologia*, 9, 48 (1966). _____
12. J. Ratcliffe и П. Смит. *Химреагент Ind.*, Стр. 925 (18 июля 1959).
13. NS Шах и Еро Himwich. *Neuropharmacol.*, 10, 547 (1971). _____
14. ВТ Но, SF Pong, Р. Браун и К. Уокер. *Experientia*, 29, 275 (1973). _____
15. Л. Demisch и Н. Seiler. *Biochem. Pharmacol.*, 24, 575 (1975). _____
16. Г. Ф. Филлипс и Дж Гардинер. *J. Pharm. Pharmacol.*, 21, 793 (1969). _____
17. Ж. Лундстр и С. Agurell. *J. Chromatogr.*, 36, 105 (1968). _____
18. LJ Riceberg, Н. Van Vunakis, и Л. Левин. *Анальный. Biochem.* 60, 551 (1974). _____
19. С. Ван Петегем, М. ван ден Heede и А. Heuyndrickx в А. Фригеро, ред., *Recent Dev. Massa Spectr. Biochem. Med.*, 4-й том. Plenum Press, Нью-Йорк, стр. 153 (1978). _____
20. JM Музаккьо и М. Голдштейн. *Biochem. Pharmacol.*, 16, 963 (1967). _____



серия монографии

В то время как ограниченные поставки последние, единичные экземпляры монографии могут быть получены бесплатно от Национального координационного механизма по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами информации (NCDAI). Пожалуйста, свяжитесь с NCDAI также для получения информации о наличии ближайших выпусков и других Издания, Национального института по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами, имеющих отношение к исследованию наркомании.

Дополнительные копии могут быть приобретены у правительства принтеров ИНГ ведомства США (GPO) и / или Национальная служба технической информации (NTIS), как указано. Цены NTIS предназначены для бумажной копии. Микрошису копии, в \$ 3,50, также доступны NTIS. Цены от любого источника могут быть изменены.

Адреса являются:

NCDAI

Национальный координационный центр по борьбе со злоупотреблением наркотическими средствами
Информация о номерах 10A-
5600 Fishers Lane
Роквилл, Мэриленд 20857

объект групповой политики
Суперинтендант документов
Government Printing Офис в США Вашингтон,
округ Колумбия 20402

NTIS
Национальная техническая информация
обслуживание
Министерство торговли США Спрингфилд,
штат Вирджиния 22161

1 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ злоупотреблением наркотическими средствами. Не доступно от NCDAI. Том 1:
ПОЧТАМТ в наличии NTIS PB # 272 867 / AS \$ 22
Том 2: ПОЧТАМТ в наличии NTIS PB # 272 868 / \$ 20

2 РАБОЧИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ В СОЦИАЛЬНО-поведенческой употреблении наркотиков ИССЛЕДОВАНИЯ
1975. Джек Элинсон, доктор философии, и Дэвид Нурсо, доктор философии, ред. Не доступно от
NCDAI. GPO в наличии
NTIS ПБ # 246 338 / \$ 11

3 аминергическая ГИПОТЕЗА ПОВЕДЕНИЯ: реальность или трафарет? Bruce J. Bernard, доктор философии,
изд.
ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00486-3 \$ 2,25
NTIS ПБ # 246 687 / \$ 11

4 НАРКОТИЧЕСКИЕ АНТАГОНИСТЫ: ПОИСКИ препаратов длительного действия. Роберт Willette, доктор философии, изд. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00488-0 \$ 1,10

NTIS ПБ # 247 096 / AS \$ 6

5 молодых мужчин и ПРЕПАРАТЫ: общенациональное обследование. Джон А. О'Доннел, доктор философии, и др.

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00511-8 \$ 2,25

NTIS PB # 247 446 / AS \$ 11

6 ВЛИЯНИЕ мечения «наркоман»: ЗАПРОС. Джей Р. Уильямс, доктор философии

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00512-6 \$ 1,05

NTIS ПБ # 249 092 / AS \$ 6

7 каннабиноидных АНАЛИЗЫ в организме человека. Роберт Willette, доктор философии, изд. ПОЧТАМТ Фото # 017-024-00510-0 \$ 1,95

NTIS PB # 251 905 / AS \$ 10

8 Rx: 3x / Неделя LAAM - АЛЬТЕРНАТИВА метадона. Джек Блейн, MD, и Пьер Рено, MD, ред. Не доступен из объекта групповой политики

NTIS PB # 253 763 / AS \$ 10

9 НАРКОТИЧЕСКИЕ АНТАГОНИСТЫ: налтрексон ОТЧЕТ О ХОДЕ. Деметрий Julius, MD, и Пьер Рено, MD, ред. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00521-5 \$ 2,55

NTIS PB # 255 833 / AS 12 \$

10 ЭПИДЕМИОЛОГИЯ злоупотребления наркотическими средствами: ТЕКУЩИЕ ПРОБЛЕМЫ. Луиза Г. Ричардс, доктор философии, и Луиза Б. Blevens, ред. *Рассматривает методологические вопросы в ходе обследований и сбора данных.* Не доступно от NCDAl. ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00571-1 \$ 2,60

NTIS PB # 266 691 / AS \$ 13

11 Наркотики и управление автомобилем. Роберт Willette, доктор философии, изд. *Отзывы исследования о воздействии наркотиков на психомоторном, сосредоточив внимание на мерах обесценения по другой препараты на различных уровнях.*

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00576-2 \$ 1,70

NTIS PB # 269 602 / \$ 11

12 психодинамика наркотической зависимости. Джек Д. Блейн, MD, и Деметрий А. Julius, доктор медицинских наук, ред. *Теоретические и клинические документы о нарушениях внутриспихических детерминантами наркомании.*

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00642-4 \$ 2,75

NTIS PB # 276 084 / AS 12 \$

13 КОКАИНА: 1977. Роберт К. Петерсен, доктор философии, и Ричард С. Still- человек, доктор медицинских наук, ред. *Отчеты степени и пределы современных знаний о кокаине, его использовании и злоупотреблении.*

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00592-4 \$ 3

NTIS PB # 269 175 / AS \$ 13

14 марихуана Результаты исследований: 1976. Роберт К. Петерсен, доктор философии, изд. *Технические документы, на которых были основаны шестая Марихуана и Доклад о состоянии здравоохранения в Конгресс.*

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00622-0 \$ 3

NTIS PB # 271 279 / AS \$ 15

15 ОБЗОР ингалянтами: ЭЙФОРΙΑ дисфункцией. Чарльз Wm. Sharp, доктор философии, и Мэри Ли Брем, доктор философии, ред. *Обзор ингаляционных злоупотребления, включая extensive библиографии.*

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00650-5 \$ 4,25

NTIS PB # 275 798 / AS \$ 19

16 эпидемиология героина и другие наркотики. Джоан Данн Rittenhouse, доктор философии, изд. *Доклад Целевой группы по научно-исследовательских технологий и последствий для изучения героина, наркотическое использование.*

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00690-4 \$ 3,50

NTIS PB # 276 357 / \$ 14

17 ИССЛЕДОВАНИЯ НА КУРЕНИЕ ПОВЕДЕНИЯ. Мюррей Е. Джарвик, кандидат медицинских наук, и др., Ред.

Включает эпидемиология, этиология, последствия

использовать, и подходы к изменению поведения. Из NIDA поддерживаемой конференции UCLA.

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00694-7 \$ 4,50

NTIS PB # 276 353 / \$ 20

18 ПОВЕДЕНИЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ: ИССЛЕДОВАНИЯ И ПОСЛЕДСТВИЯ ЛЕЧЕНИЕ. Норман А. Krasnegor, доктор философии, изд. *Теоретические и эмпирические исследования нефармакологических субъектов в развитии толерантности наркотиков.*

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00699-8 \$ 2,75

NTIS PB # 276 337 / \$ 11

19 МЕЖДУНАРОДНЫЙ ВЫЗОВ злоупотребления наркотическими средствами. Роберт К. Петерсен, доктор философии, изд. *Документы от VI Всемирного конгресса по психиатрии, которые занимаются проблемами наркотиков, представляющих особый интерес во всем мире.*

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00822-2 \$ 4,50

NTIS PB # 293 807 / AS \$ 19

20 самоуправление злоупотребляя ВЕЩЕСТВ: Методы исследования. Норман А. Krasnegor, доктор философии, изд. *Методы, используемые для изучения основных процессов, лежащее злоупотребления наркотиков, этанола, продуктов питания и табака.*

Не доступен из объекта групповой политики

NTIS PB # 288 471 / AS \$ 15

21 Phencyclidine (PCP) НАРУШЕНИЯХ: AN APPRAISAL. Роберт К. Петерсен, доктор философии, и Ричард С. Стиллман, MD, ред. *Новаторский объем для врачей и исследователей, оценивающих то, что известно о проб- антов злоупотребления PCP.*

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00785-4 \$ 4,25

NTIS PB # 288 472 / AS \$ 17

22 КВАЗАРА: Количественный состав АКТИВНОСТЬ ВЗАИМООТНОШЕГОСЯ ANALGE- SICS, НАРКОТИЧЕСКИЕ антагонисты и галлюциногены. Джин Vamett, Ph.D. ; Милан Trsic, Ph.D. ; и Роберт Willette, Ph.D. ; ред. *Доклады междисциплинарной конференции по молекулярной природе лекарственно рецепторных взаимодействий.*

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00786-2 \$ 5,25

NTIS PB # 292 265 / AS \$ 24

23 Курильщик КАК ПРОЦЕСС ЗАВИСИМОСТИ. Норман А. Krasnegor, доктор философии, изд. *Рассматриваются факторы, влияющие на началом, обслуживание и прекращение привычки курения сигарет.*

Включает в себя программу

для дальнейших исследований.

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00895-8 \$ 4,50

NTIS PB # 297 721 / AS \$ 13

24 SYNTHETIC СМЕТА МАЛЫХ РАЙОНОВ: СТАТИСТИЧЕСКАЯ СЕМИНАРА ДОКУМЕНТОВ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Джозеф Steinberg, изд. Документы из мастерской со-

при поддержке NIDA и Национального центра медицинской статистики по классу статистических подходов, которые дают необходимые оценки данных для государств и местных районов.

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00911-3 \$ 5

NTIS PB # 299 009 / AS \$ 16

25 поведенческого анализа и Treatment О токсикомании. Норман А. Krasnegor, доктор философии, изд. *Документы, присутствующие общности и последствие для лечения зависимости от наркотиков, этанола, продуктов питания и табака.*

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00939-3 \$ 4,50

NTIS PB # 80-112428 \$ 15

26 Поведенческие АСПЕКТЫ КУРЕНИЯ. Норман А. Krasnegor, Ph.D. , Изд. *Перепечатка поведенческой части 1979 Доклад хирурга о курении и Health, с введением редактора.*

GM Stock # 017-024-00947-3 \$ 4,25

NTIS PB # 80-118755 \$ 12

27 ПРОБЛЕМЫ нарколечению 1979: Труды 41-й годов- Nual НАУЧНОГО заседании Комитета по проблемам нарколечению INC.

Louis S. Harris, доктор философии, изд. *Комплексная сборка*

проводимых исследований по проблеме злоупотребления наркотиками, наркомании и новых соединений.

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00981-4 \$ 8

NTIS PB # 80-175482 \$ 25

28 НАРКОТИЧЕСКИЕ АНТАГОНИСТЫ.: Налтрексон Фармакохимия И замедленным RELEASE ПРЕПАРАТЫ (DRUG DEVELOPMENT TOM VI Gene Барнетт, доктор философии, и Роберт Willette, доктор философии, ред. *Документы сообщают исследования по вставленному с замедленным высвобождением и длительно действующими устройствами наркотиков, и о возможности использовании с наркотическим антагонистом налтрексона.*

В процессе подготовки

29 НАРУШЕНИЙ НАРКОТИКОВ СМЕРТИ в девяти городов: сюрвейерский. Луис А. Готшалк, MD, и др. *Эпидемиологическое исследование, предоставляющие данные о наркотиках вовлеченной смерти и процедурах для их исследований.*

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00982-2 \$ 4,25

NTIS PB # 80-178882 \$ 12

30 ТЕОРИЙ НА НАРКОТИЧЕСКИЕ: ОТДЕЛЬНЫЕ СОВРЕМЕННЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ. Dan J. Lettieri, доктор философии .; Mollie Сейерс; и Хелен Валленштейн; ред. *Объем представлены конспекты основных современных теорий злоупотребления наркотиков каждый из 43 ведущих теоретиков.*

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-00997-1 \$ 8,50

Не доступно от NTIS

31 марихуана Результаты исследований: 1980. Роберт К. Петерсен, доктор философии, изд. *Обзор текущих исследований марихуаны, в том числе технических документов, на которых основываются восьмая Marijuana и Доклад о состоянии здравоохранения в Конгресс.*

ПОЧТАМТ Stock # 017-024-01010-3 \$ 5

NTIS PB # быть назначены

Департамент здравоохранения и
социальных служб

ОБЩЕСТВЕННОЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЕ

СПИРТ, наркотики, а также
ПСИХИЧЕСКОЕ ЗДОРОВЬЕ УПРАВЛЕНИЕ
5600 FISHERS LANE Роквилла 20857

ОФИЦИАЛЬНЫЙ БИЗНЕС Penalty для
личного пользования, \$ 300

ПОЧТОВЫЙ И СБОРЫ ПЛАТНЫХ
ДЕПАРТАМЕНТ США HHS

HHS 396

ТРЕТИЙ КЛАСС
ОСНОВНАЯ СТАВКА



УВЕДОМЛЕНИЕ ОБ ИЗМЕНЕНИИ ПОЧТЕ

- Проверьте здесь, если вы хотите прекратить получать этот тип публикации
- Проверьте здесь, если ваш адрес изменился, и вы хотите продолжать получать этот тип публикации.
(Обязательно предоставить свой полный адрес, включая почтовый индекс).

Оторвите крышку с адресным ярлыком еще прикрепленными и отправить

Алкоголизма, наркомании и психического здоровья Управление печати и
публикации Сектор управления 5600 Fishers Lane (Rm. 6C-02) Роквилл,
Мэриленд 20857