

МАТЕРИАЛОВЕДЧЕСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА ОБЪЕКТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ДИАЗЕПАМ, ЛОРАЗЕПАМ И БУПРЕНОРФИН. ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В СООТВЕТСТВИИ С ТРЕБОВАНИЯМИ МЕЖДУНАРОДНОГО СТАНДАРТА ISO/IEC 17025:2005

А.Г. Товмасын, К.С. Караджян

Национальное бюро экспертиз НАН РА

В отдел физико-технических исследований и химических экспертиз Национального бюро экспертиз НАН РА часто на экспертизу заказчик предоставляет не только целостные таблетки, капсулы, ампулы, порошкообразные вещества, предметы, пропитанные различными наркотическими и психотропными средствами, но и различные курительные смеси без всяких надписей. В связи с этим возникает необходимость выяснить, принадлежат ли эти исследуемые объекты к наркотическим, психотропным, сильнодействующим или токсичным веществам, или же они являются их прекурсорами. Проводится количественный расчет исследуемых объектов.

Рассматриваются вопросы проведения количественного расчета, оценки неопределенности измерений и построения калибровочных кривых наркотических средств, содержащих диазепам, лоразепам и бупренорфин. С целью определения перечисленных компонентов, содержащихся в составе представленных на экспертизу исследуемых объектов, разработан и валидирован метод газовой хроматографии (с использованием газового хроматографа модели "НР-6890") в соответствии с требованиями международного стандарта ISO/IEC 17025:2005. Валидация разработанного метода выполнена в соответствии со следующими параметрами: особенность (специфичность), линейность, точность, стабильность и воспроизводимость. Реализация разработанного метода поможет обеспечить более эффективное и достоверное выполнение газохроматографического анализа.

Ключевые слова: калибровочные кривые, валидация метода, наркотические вещества, газовая хроматография, неопределенность, линейность.

Введение. В отдел физико-технических исследований и химических экспертиз Национального бюро экспертиз Республики Армения нередко предпринимающая сторона (заявитель, заказчик) представляет на экспертизу предметы, пропитанные различными наркотическими и психотропными средствами, а также неизвестные таблетки, капсулы, ампулы, порошкообразные вещества и различные курительные смеси без всяких надписей. В каждом из перечисленных случаев при проведении экспертных исследований возникает необходимость выяснить, принадлежат ли эти объекты к наркотическим или психотропным, сильнодействующим или токсичным веществам, или же они являются их прекурсорами. По итогам выполненных экспертиз при обнаружении перечисленных выше исследуемых объектов в наркотических соединениях проводится количественный расчет активного компонента.

Поэтому, учитывая актуальный и прикладной характер данного вопроса, в соответствии с требованиями международного стандарта ISO/IEC 17025:2005 для используемого метода газовой хроматографии (газовый хроматограф модели "НР-6890") был разработан и валидирован метод количественного расчета и оценки неопределенности измерений для диазепама, лоразепама и бупренорфина – компонентов, содержащихся в составе представленных на экспертизу исследуемых объектов.

Важно подчеркнуть также, что расчёт значений неопределенности измерений при проведении судебно-материаловедческих экспертиз исследуемых объектов позволяет обеспечить проведение

более доступного, эффективного и достоверного количественного расчета в соответствии с требованиями международного стандарта ISO/IEC 17025:2005 [1].

Экспериментальная часть. Объектами исследования явились диазепам, лоразепам и бупренорфин, которые наиболее часто встречаются при экспертизе наркотических веществ.

Краткая характеристика исследованных соединений приводится ниже.

Диазепам (рис.1). Эмпирическая формула - $C_{16}H_{13}ClN_2O$.

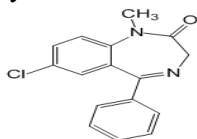


Рис. 1. 4,7-хлор-1,3-дигидро-1-метил-5-фенил-2Н-1,4-бензодиазепин-2-он

Молекулярная масса - 284,7. Относится к ряду бензодиазепинов и обладает анксиолитическим, успокаивающим, снотворным, противоэпилептическим действием [2,3].

Лоразепам (рис.2). Эмпирическая формула - $C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$.

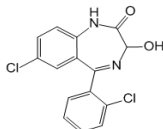


Рис. 2. 7-хлор-5-(2-хлорфенил)-1,3-дигидро-3-гидрокси-2Н-1,4-бензодиазепин-2-он

Молекулярная масса - 321,2. Относится к ряду бензодиазепинов и обладает анксиолитическим, успокаивающим, снотворным, противоэпилептическим действием [2,3].

Бупренорфин (рис.3). Эмпирическая формула - $C_{29}H_{41}NO_4$.

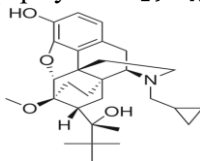


Рис. 3. [5-альфа,7-альфа(S)]-17-(циклопропилметил)-альфа-(1,1-диметилэтил-4,5-эпокси-18,19-дигидро-3-гидрокси-6-метокси-альфа-метил-6,14-этенморфин-7-метан

Молекулярная масса - 504,1. Является частичным агонистом опиоидных рецепторов и обладает обезболивающим свойством [2,3].

В работе использованы: стандарт диазепама (Lipomed GMP-Documet QC-CA-107), стандарт гидрохлорида бупренорфина (Batch: 3858-0292-30(B) (Reckitt and Coleman), стандарт лоразепама (UNIX 593, UNODC), метилстеарат (SIGMA-ALDRICH; CAS 112-61-8), метанол (SIGMA-ALDRICH; CAS 67-56-1), этанол (SIGMA-ALDRICH; CAS 64-17-5), хлороформ (SIGMA-ALDRICH; CAS 67-66-3).

Хроматографический метод анализа.

Исследования выполнены с помощью газового хроматографа модели "HP-689" при следующих условиях:

- ✓ детектор – пламенно-ионизационный;

- ✓ колонка - стеклянная, капиллярная, 10 м;
- ✓ жидкая фаза - силоксан;
- ✓ газ-носитель - водород;
- ✓ температура испарителя - 250°C;
- ✓ температура детектора - 250°C;
- ✓ температура камеры- 75 ... 280°C (25 °C/с) [1,4].

В качестве внутреннего стандарта был использован этаноловый или метаноловый раствор метилстеарата с концентрацией 1 мг/мл.

Приготовление концентрированных (предварительных) и рабочих стандартов, а также растворных образцов.

Приготовление концентрированного стандартного раствора диазепама. 10 мг стандарта диазепама было загружено в вialу, в которую затем был добавлен метанол в объёме 1 мл, и перемешиванием было достигнуто его полное растворение. Концентрация полученного 1 мл раствора составила 10 мг/мл (образец DIAZEP1).

Приготовление концентрированного стандартного раствора лоразепама. 10 мг стандарта лоразепама было загружено в вialу, в которую затем был добавлен метанол в объёме 1 мл, и перемешиванием было достигнуто его полное растворение. Концентрация полученного 1 мл раствора составила 10 мг/мл (образец LORAZEP1).

Приготовление концентрированного стандартного раствора бупренорфина. 10 мг стандарта бупренорфина было загружено в вialу, в которую затем был добавлен метанол в объёме 1 мл, и перемешиванием было достигнуто его полное растворение. Концентрация полученного 1 мл раствора составила 10 мг/мл (образец BUPR1).

Приготовление стандартных рабочих растворов диазепама, лоразепама и бупренорфина. Приготовление стандартных рабочих растворов диазепама, лоразепама и бупренорфина было выполнено аналогично приготовлению стандартных рабочих растворов (-)-дельта-9-тетрагидроканнабинола [5].

Все объёмные измерения были проведены с помощью измерительной микропипетки фирмы "Ассимах", предусмотренной для измерения микро- количеств в пределах 100...1000 мкл [6-8].

Результаты экспериментов. С целью количественного определения и построения калибровочных кривых, а также оценки неопределенности измерений для компонентов диазепама, лоразепама и бупренорфина были произведены вколы в инжектор газового хроматографа модели "НР-6890" заранее приготовленных концентрированных и рабочих стандартных растворов в объёме 1 мкл. Для каждого компонента и концентрации были произведены 3...4 вкола (в частности, для диазепама - образец DIAZEP1 - 3 вкола, соответственно DIAZEP1/1.D, DIAZEP1/2.D и DIAZEP1/3.D) [2,6,7,9].

Результаты исследований для каждого компонента в отдельности (количество вколов, время удержания веществ, концентрация растворов [C], площадь пиков [F]) приведены в табл. 1-3.

Таблица 1

Результаты исследования диазепама

Наименование образца	Время удержания, мин	Концентрация растворов, мг/мл	Площадь пиков, PA*s
DIAZEP1/1.D	7,598	10	4629,7
DIAZEP1/2.D	7,592	10	5009,2
DIAZEP1/3.D	7,596	10	4749,1
DIAZEP2/1.D	7,583	5	2721,7

DIAZEP2/2.D	7,582	5	2490,8
DIAZEP2/3.D	7,584	5	2590,3
DIAZEP3/2.D	7,567	2,5	1069,3
DIAZEP3/3.D	7,57	2,5	1033,2
DIAZEP3/4.D	7,567	2,5	763
DIAZEP4/1.D	7,562	1,25	505,4
DIAZEP4/2.D	7,563	1,25	487,9
DIAZEP4/3.D	7,563	1,25	435,4
DIAZEP4/4.D	7,564	1,25	579
DIAZEP5/1.D	7,563	0,625	311,8
DIAZEP5/2.D	7,564	0,625	390,9
DIAZEP5/3.D	7,564	0,625	430,5
DIAZEP5/4.D	7,565	0,625	459

Таблица 2

Результаты исследования лоразепама

Наименование образца	Время удержания, мин	Концентрация растворов, мг/мл	Площадь пиков, РА*s
LORAZEP1/1.D	7,5	10	3592,3
LORAZEP1/2.D	7,498	10	3209,5
LORAZEP1/3.D	7,499	10	3002,4
LORAZEP2/1.D	7,486	5	1593,1
LORAZEP2/2.D	7,486	5	1341,1
LORAZEP2/3.D	7,487	5	904,1
LORAZEP3/1.D	7,475	2,5	664,8
LORAZEP3/2.D	7,475	2,5	503,5
LORAZEP3/3.D	7,476	2,5	488,6
LORAZEP3/4.D	7,48	2,5	859,4
LORAZEP4/1.D	7,475	1,25	250
LORAZEP4/2.D	7,475	1,25	241,2
LORAZEP4/3.D	7,479	1,25	228,1
LORAZEP4/4.D	7,477	1,25	279,4
LORAZEP5/1.D	7,487	0,625	103,4
LORAZEP5/2.D	7,483	0,625	176,8
LORAZEP5/3.D	7,491	0,625	88,2
LORAZEP5/4.D	7,488	0,625	92,8

Таблица 3

Результаты исследования бупренорфина

Наименование образца	Время удержания, мин	Концентрация растворов, мг/мл	Площадь пиков, РА*s
BUPR1/1.D	10,721	10	4227,3
BUPR1/2.D	10,7	10	3359,3
BUPR1/3.D	10,713	10	3660,7
BUPR2/1.D	10,683	5	1906,6
BUPR2/2.D	10,687	5	1947,7
BUPR2/3.D	10,679	5	1841,6
BUPR3/1.D	10,645	2,5	1115,7
BUPR3/2.D	10,642	2,5	848,3
BUPR3/3.D	10,656	2,5	766,6
BUPR3/4.D	10,664	2,5	932,5
BUPR4/1.D	10,643	1,25	493,5
BUPR4/2.D	10,641	1,25	391,1
BUPR4/3.D	10,646	1,25	355,8
BUPR4/4.D	10,649	1,25	354,3
BUPR5/1.D	10,648	0,625	168,2

BUPR5/2.D	10,648	0,625	171,9
BUPR5/3.D	10,655	0,625	172,7
BUPR5/4.D	10,651	0,625	172,2

Концентрации каждого компонента были перепроверены, как минимум, трехкратно, а расчётные значения площадей пиков были усреднены. На рис. 4-6 отдельно приведены калибровочные зависимости площадей пиков от концентраций для каждого из трёх исследуемых объектов. Полученные линейные зависимости ($y=kx$) позволяют рассчитать коэффициент k , используемый в дальнейшем при вычислении значения неопределённости измерений. Так, обработка построенных калибровочных кривых позволила рассчитать коэффициенты k для диазепама, лоразепама и бупренорфина, которые составили соответственно 481,9; 308,0 и 374,4.

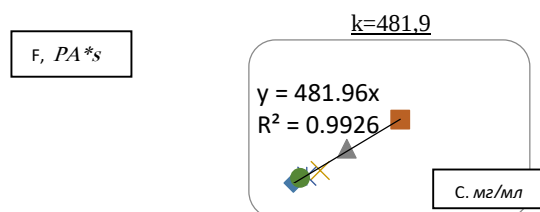


Рис. 4. Калибровочная кривая для диазепама

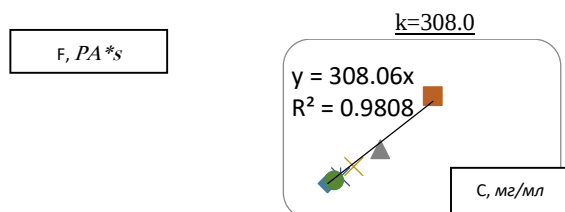


Рис. 5. Калибровочная кривая для лоразепама

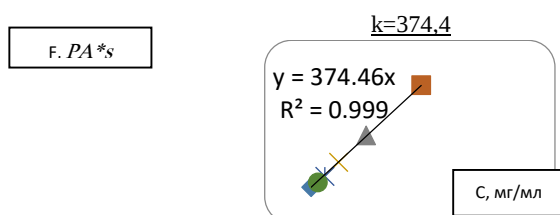


Рис. 6. Калибровочная кривая для бупренорфина

Расчёт оценки неопределённости измерений. Алгоритм расчёта оценки неопределённости измерений включает в себя определенные последовательные шаги, которые подробно описаны [5].

Реализуя описанную выше последовательность расчётов, нами были вычислены значения неопределённости измерений для фирменных стандартов диазепама, лоразепама и бупренорфина (первичный стандарт), которые составили соответственно $\pm 0,551$; $\pm 0,856$ и $\pm 0,693$ мг/мл.

При проведении экспертиз, в случае необходимости количественного расчёта экспериментальных значений исследуемых таблеток, жидкостей, в которых содержатся описанные выше компоненты, от исследуемых таблеток отбирается соответствующая аликвота образца, а при исследовании жидкостей от последних отбирается 1 мл, который досушивается до стабильного сухого остатка. Из отобранных образцов с помощью химически чистых растворителей (метанол,

этанол, хлороформ, гексан и т.п.) готовятся экстракты в объёме 1 мл, к которым затем добавляется равное количество метанольного раствора метилстеарата с концентрацией 1 мг/мл. Вслед за этим каждый образец подвергается трёхкратному газохроматографическому анализу, а полученные усредненные значения площадей пиков делятся на заранее вычисленные значения коэффициентов k.

Таким образом, вычисленные значения представляют собой концентрации рассматриваемых в данной статье компонентов, содержащихся в исследуемых экспериментальных образцах, массы которых были заранее известны. На заключительном этапе проводится расчет концентрации для изначально исследуемого объекта в целом. Полученная концентрация соответствует количеству исследуемого объекта в граммах [10-13].

Валидация разработанного метода. Валидация разработанного метода выполнена в соответствии со следующими параметрами: особенность (Specificity), линейность (Linearity), точность (Accuracy), стабильность (Repeatability) и воспроизводимость (Intermediate precision).

Особенность (специфичность) - показывает, что исследуемые компоненты диазепама, лоразепама и бупренорфина имеют определенные времена удержания (Retention times), и данные значения отличаются от времени удержания компонентов растворителя и других веществ (см. табл.1-3) [1,9].

Линейность - показывает, что площади соответствующих пиков, полученных в результате вколов рабочих стандартных растворов, находятся в линейной зависимости от концентрации этих растворов. Исследования были проведены с использованием 5 концентраций рабочих стандартных растворов. Корреляция считается линейной при коэффициенте $r^2 \geq 0,99$. При исследовании 5 концентрационных точек в диапазоне 0,625...10 мг/мл для диазепама, лоразепама и бупренорфина коэффициент корреляции составляет соответственно $r^2=0,9956$ (рис.4), $r^2=0,9950$ (рис.5) и $r^2=0,9998$ (рис.6) [1,9,10].

Точность – показывает, что разработанным методом корректно определяются концентрации исследуемых растворов. Исследования были проведены для трёх стандартных растворов трёх разных концентраций с трёхкратным повторением вколов для каждой концентрации [1,9] с последующим выведением среднего арифметического значения полученных величин.

Стабильность - показывает, что хроматографическая система устойчива, и при повторных исследованиях одного и того же образца была достигнута воспроизводимость результатов (табл.1-3) [1,9].

Воспроизводимость - показывает, что при проведении исследований на следующий день или исследований, выполненных другим сотрудником, обеспечивается воспроизводимость измерений [1,9].

Для подтверждения достоверности количественных определений были выполнены следующие исследования. Последовательно проводили вколы рабочих стандартных растворов диазепама, лоразепама и бупренорфина трёх различных концентраций, которые заранее были приготовлены разбавлением соответствующих концентрированных стандартных растворов (см. экспериментальную часть). Затем ко всем приготовленным растворам было добавлено равное количество метанольного раствора метилстеарата с концентрацией 1 мг/мл. С каждым из приготовленных образцов были проведены трёхкратные газохроматографические исследования с получением особенных (специфичных), линейных, точных, повторяемых и воспроизводимых результатов. Таким образом, в настоящее время количественные расчеты (определения) соответствующих компонентов в исследуемых образцах, представляемых на экспертизу, выполняются на основе описанных выше методов и с использованием полученных значений

неопределенности измерений в соответствии с требованиями международного стандарта ISO/IEC 17025:2005.

Заключение. В отделе физико-технических исследований и химических экспертиз Национального бюро экспертиз Республики Армения разработан и внедрён в судебно-экспертную практику валидированный метод количественного расчёта и оценки неопределённости измерений для диазепамы, лоразепамы и бупренорфина – компонентов, содержащихся в составе исследуемых объектов. Реализация на практике разработанного метода в соответствии с требованиями международного стандарта ISO/IEC 17025:2005 позволит обеспечить более эффективное и достоверное выполнение газохроматографических анализов с помощью газового хроматографа модели "НР-6890".

Литература

1. "Agilent Technologies 6890, Gas Chromatograph, Control", 03-914947-32:Rev. 10.
2. **Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В.** Анализ наркотических средств.- М.: Мысль, 1993.- 259 с.
3. **Машковский М.Д.** Лекарственные средства. – 15-е изд. - М.: ПИА "Новая волна", 2010.- 1206 с.
4. "Agilent 6890N Gas Chromatograph, User Information", Released.- MAY, 2001. - Part No. G1530-90210.
5. Журнал «Вестник 2017 №1».
6. "Guidelines on Representative Drug Sampling, in cooperation with the Drugs Working Group of the European Network of Forensic Science Institutes, UNITED NATIONS.- New York, 2009.-76 p.
7. "GUIDELINES ON SAMPLING OF ILLICIT DRUGS FOR QUANTITATIVE ANALYSIS", ENFSI DRUGS WORKING GROUP, REF. CODE: DWG-GQS-002.- April, 14 th, 2014.
8. РУКОВОДСТВО для предприятий фармацевтической промышленности (методические рекомендации).- Часть I-III. – М.: Издательство "Спорт и Культура", 2007.- 190 с.
9. Validation of analytical Procedures, Guide to Good Manufacturing Practise for medical products. Part 2, PIC/S.- January, 2013. – 50 p.
10. www.easycalculator.com/statistics/correlation.php
11. "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement", EURACHEM/ CITAC Guide - CG4. 2012.– 133 p.
12. "A Guide on Measurement Uncertainty in Chemical and Microbiological Analysis" Technical Guide 2 ACCREDITED LABORATORY SAC-SINGLAS. - 2008. - 104 p.
13. "HANDBOOK FOR CALCULATION OF MEASUREMENT UNCERTAINTY IN ENVIRONMENTAL LABORATORIES". - 2003.-5. – 41 p.

*Поступила в редакцию 14.03.2017.
Принята к опубликованию 12.12.2017.*

ԴԻԱԶԵՊԱՄ, ԼՈՐԱԶԵՊԱՄ ԵՎ ԲՈՒՊՐԵՆՈՐԲԻՆ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ ՕՐՅԵԿՏՆԵՐԻ ՆՅՈՒԹԱԳԻՏԱԿԱՆ ՓՈՐՁԱՔՆՆՈՒԹՅՈՒՆԸ: ԳԱԶ-ՔՐՈՄԱՏԱԳՐՄԱՆ ՄԵԹՈՂԻ ՎԱԼԻԴԱՑՈՒՄԸ՝ ԻՍՕ/ԻԷԿ 17025:2005 ՄԻՋԱԶԳԱՅԻՆ ՍՏԱՆԴԱՐՏԻ ՊԱՀԱՆՋՆԵՐԻՆ ՀԱՄԱՁԱՅՆ

Ա.Գ. Թովմասյան, Կ.Ս. Ղարաջյան

ՀՀ ԳԱԱ «Փորձաքննությունների ազգային բյուրո» ՊՈԱԿ-ի ֆիզիկատեխնիկական հետազոտությունների և քիմիական փորձաքննությունների բաժին շատ հաճախ փորձաքննության են ներկայացվում առանց որևէ գրառման, հաճախ ոչ ամբողջական դեղահատեր, դեղապատիճներ, փոշենման զանգվածներ, ինչպես նաև սրվակավորված հեղուկներ, բուսական ծխախոտային խառնուրդներ և այլ օբյեկտներ, որոնք անհրաժեշտ է

նույնականացնել, պարզել, թե նշված օբյեկտները հանդիսանում են արդյոք թմրամիջոցներ, հոգեմետ նյութեր կամ դրանց պրեկուրսորներ, խիստ ներգործող կամ թունավոր նյութեր, դրանց բաղադրության մեջ արդյոք պարունակվում են թմրակտիվ կամ հոգեմետ բաղադրատարրեր, թե ոչ: Դրանից հետո կատարվում են հետազոտվող օբյեկտներում պարունակվող թմրակտիվ կամ հոգեմետ բաղադրատարրերի քանակական հաշվարկներ:

Իրականացվել են դիագնոստիկ, լորագեպամ և բուպրենորֆին բաղադրատարրերի կալիբրման կորերի ստացում, քանակական հաշվարկ և անորոշության գնահատում "HP-6890" մոդելի գազ-քրոմատագրման սարքով՝ քրոմատագրման մեթոդի կիրառմամբ: Փորձաքննությանը ներկայացվող օբյեկտներում նշված բաղադրատարրերի որոշման նպատակով կատարվել է վերջիններիս քանակական որոշման գազ-քրոմատագրման մեթոդի վալիդացումը՝ համաձայն ԻՍՕ/ԻԷԿ 17025:2005 ստանդարտների պահանջներին: Մշակված մեթոդը վալիդացվել է՝ համաձայն հետևյալ կետերի՝ յուրահատկություն, գծայնություն, ճշգրտություն, կրկնելիություն և վերարտադրելիություն: Մշակված մեթոդը թույլ կտա գազ-քրոմատագրման անալիզներն իրականացնել հնարավորինս արագ, ճշգրտորեն և արդյունավետ:

Առանցքային բաներ. կալիբրման կորեր, մեթոդի վալիդացում, թմրանյութեր, գազ-քրոմատագրում, անորոշություն, գծայնություն:

THE DIAZEPAM, LORAZEPAM AND BUPRENORPHINE - CONTAINING OBJECTS' VALIDATION METHOD IN ACCORDANCE WITH ISO/IEC 17025:2005 STANDARD REQUIREMENTS TO THE MATERIOLOGICAL EXPERTISE OF THE OBJECTS

A.G. Tovmasyan, K.S. Gharajyan

The department of physico-technical investigations and chemical expertise of the RA National Bureau of Expertise, not only whole tablets, capsules, ampulles, powder substances, objects soaked with various narcotic and psychotropic means are submitted to be checked, but also different smoking mixtures without any inscriptions. In connection with this, it becomes necessary to find out if these studied objects belong to the narcotic, psychotropic, strongly-acting or toxic substances, or they are their precursors. The quantitative calculation of the studied objects is carried out.

Issues on carrying out a quantitative calculation, estimation of the measurement uncertainty and construction of standard curves of narcotic means containing diazepam, lorazepam and buprenorphine are considered. For the purpose of determining the mentioned components contained in the investigated objects to be subjected to expertise, a method of gas chromatography is developed and validated (by using a gas chromatograph of the model HP-6890) in accordance with the requirements of the International standard ISO / IEC 17025: 2005. The validation of the developed method is carried out according to the following parameters: peculiarity (specificity), linearity, accuracy, stability and reproducibility. The implementation of the developed method will allow to ensure a more efficient and trustworthy accomplishment of gas chromatographic analysis.

Keywords: standard curve, method validation, narcotic substances, gas chromatography, uncertainty, linearity.