

ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИИ В ТОНКОМ СЛОЕ СОРБЕНТА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МЕТАДОНА И ЕГО ОСНОВНОГО МЕТАБОЛИТА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

И.Д. Шилейко¹, А.М. Чубуков²

¹Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск

²Городской клинический наркологический диспансер, г. Минск

Резюме. Описанные в статье исследования относятся к области химико-токсикологического анализа. В ходе исследования разработаны эффективные способы изолирования метадона и продуктов его метаболизма из биологических жидкостей методом жидкость-жидкостной экстракции, а также идентификации метадона и его основного метаболита с применением метода хроматографии в тонком слое сорбента. В результате разработана технология диагностики метадона в организме человека.

Ключевые слова. Судебно-медицинская токсикология, метадон.

ВВЕДЕНИЕ. В последние годы значительно увеличилось количество потребителей психоактивных веществ (ПАВ). Наряду с наркотическими средствами растительного происхождения, такими как опийные алкалоиды, каннабиноиды, на нелегальном рынке активно распространяются синтетические ПАВ, к числу которых относится метадон. В Беларуси метадон разрешен к контролируемому обороту и используется для лечения больных с опиатной зависимостью, в то же время регулярно выявляются случаи его нелегального употребления с целью получения состояния одурманивания.

Метадон (6-диметиламино-4, 4-дифенил-3-гептанон) – производное фенилгептанона, относится к синтетическим заменителям опийных алкалоидов (синтетическим опиоидам), имеет высокое сродство к μ -опиоидным рецепторам и является μ -агонистом длительного действия, вследствие чего при злоупотреблении вызывает клиническую картину опьянения, подобную таковой при употреблении опийных алкалоидов, но имеет более продолжительный период действия. В терапевтических дозах проявляет анальгезирующее и седативное действие [1,2]. Эти свойства позволяют использовать метадон для детоксикации и поддерживающего лечения пациентов с опиатной зависимостью [1].

Метадон одинаково эффективен как при парентеральном, так и энтеральном способах введения. Биодоступность при приеме в виде инъекций составляет 100%, при энтеральном приеме – от 41% до 90% [2,3]. Важной особенностью метадона является высокая степень связывания с белками плазмы, которая по данным различных источников литературы может составлять до 87% [3,4,5], что приводит к частичной биологической инактивации вещества.

Метаболизм метадона происходит главным образом в печени путем деметилирования. В

результате образуются около 10 метаболитов, основным из которых является 2-этилиден-1,5-диметил-3,3-дифенилпирролидин (ЭДДП). Все основные метаболиты фармакологически неактивны [3]. Однако выявление ЭДДП имеет важное диагностическое значение, поскольку его наличие в организме является прямым свидетельством употребления метадона, даже при отсутствии в исследуемом биологическом объекте нативного вещества.

В последнее время значительное внимание уделяется разработке и внедрению в практику современных методов химико-токсикологического анализа. Специалисты рекомендуют использовать для лабораторной идентификации метадона как скрининговые, так и подтверждающие методы химико-токсикологического анализа (ХТА) [6,7]. Наиболее распространенными методами предварительного анализа являются иммунные, такие как иммунохимические, поляризационный флуороиммуноанализ, радиоиммунный анализ и др. [6,7]. Однако эти методы обладают недостаточной специфичностью, поэтому некоторые вещества (например, дифенилгидрамин и доксиламин) могут давать ложноположительные реакции на метадон [7].

В современных условиях для проведения химико-токсикологических исследований все чаще используются дорогостоящие аналитические комплексы и практически не ведутся разработки по применению метода хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ) для выявления наличия наркотиков в организме. Как показывает практика, метод ТСХ уступает по чувствительности современным аппаратным методам ХТА, однако, является простым в исполнении, менее затратным и более доступным для химико-токсикологических лабораторий [8]. Преимуществом этого метода является высокая производительность (по числу одновременно анализируемых проб), достаточная разделяющая способность и возможность визуализации хроматографических зон разделенных веществ путем обработки хроматографических пластин различными реагентами [9]. Следует отметить, что ТСХ может применяться не только для выделения обнаруживаемых веществ и их идентификации, но и для дополнительной очистки полученных извлечений, а в модифицированном виде – в качестве подтверждающего метода ХТА [10].

Цель настоящего исследования – разработка методики идентификации метадона и его основного метаболита (ЭДДП) в биологических жидкостях организма человека с применением хрома-

тографии в тонком слое сорбента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Исследование производилось на базе химико-токсикологической лаборатории учреждения здравоохранения «Городской клинический наркологический диспансер» г. Минска, РБ. Материалом для исследования служили образцы плазмы крови и мочи 280 пациентов наркологического диспансера.

Кровь в объеме 8 мл отбиралась пункцией кубитальной вены в сухой флакон, содержащий 2 капли гепарина, после чего центрифугировалась при 1500 об./мин в течение 5 мин для получения плазмы, которая в дальнейшем подвергалась исследованию. Моча в объеме 20 мл отбиралась в сухой флакон без консервантов.

Для предварительного выявления метадона использовался иммунохроматографический метод с применением экспресс-тестов на основе моноклональных антител, при положительном результате дальнейшая идентификация метадона и его метаболита ЭДДП производилась методом хроматографии в тонком слое сорбента, в качестве подтверждающего метода использовалась газовая хроматография с масс-спектральным детектированием (Agilent 6890N/5975B, США).

Подготовка проб биологических жидкостей осуществлялась способом жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ). Для оценки эффективности экстракции и выбора оптимальных экстрагентов применялись следующие смеси органических растворителей:

- хлористый метилен – гептан – изопропиловый спирт (7:2:1);
- хлороформ – изопропиловый спирт (9:1);
- хлороформ – н-бутиловый спирт (9:1);
- хлороформ.

Исследование в тонком слое сорбента осуществлялось на хроматографических пластинах Sorbfil, производства «Сорбполимер», РФ (тип сорбента – силикагель СТХ – 1А, зернением 8 – 12 мкм).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Получение достоверного результата ХТА в значительной степени зависит от выбора оптимального способа подготовки проб исследуемого материала. Большинство метаболитов наркотических средств и лекарственных веществ, являясь более полярными соединениями, чем нативные вещества, в водных растворах частично или полностью диссоциируют на ионы. Ионы, несущие определенный заряд, хорошо гидратируются диполями воды. Связь ионов с диполями воды относительно прочная, поэтому ионы остаются в водной фазе и не экстрагируются органическими растворителями. Степень экстракции таких веществ зависит от pH среды [11]. Для выделения метадона и его основного метаболита (ЭДДП) из биологических жидкостей оптимальной является среда с pH 9,0 – 10,0.

В ходе проведенного исследования оценивалась эффективность экстракции с применением различных смесей органических растворителей.

В результате установлено, что оптимальными экстрагентами для изолирования метадона являются смеси: хлористый метилен – гептан – изопропиловый спирт и хлороформ – изопропиловый спирт. Эффективность выделения метадона при использовании этих растворителей составила соответственно 80,5% и 79,5% (средние значения, полученные в серии исследований). Преимуществом ЖЖЭ с применением указанных растворителей является возможность исследования небольших объемов биологических жидкостей: для проведения эффективной экстракции достаточно 10 мл мочи и 3 мл плазмы.

Применение хлороформа и смеси хлороформ – н-бутиловый спирт для выделения метадона из биологических жидкостей нецелесообразно в связи с низкой эффективностью экстракции (58,7% и 50,1% соответственно).

В ходе исследования также оценивалась эффективность ЖЖЭ с добавлением инертной соли. Как подчеркивают некоторые авторы, эффект высаливания позволяет уменьшить растворимость аналита в водной фазе и снижает смешиваемость воды с органическим растворителем, тем самым улучшая процесс экстракции [7]. В качестве высаливающего агента в нашем исследовании использовался хлорид натрия, применение которого повысило эффективность экстракции на 2 – 3%.

В процессе биотрансформации токсикантов может происходить конъюгация молекул исходного вещества (или продуктов метаболизма) с эндогенными соединениями, такими как глюкуроновая кислота, глутатион, ионы сульфата [12]. Образование высокомолекулярных конъюгатов вызывает определенные трудности при экстракции, в таких случаях перед проведением ЖЖЭ необходима стадия их разрушения – гидролиз.

В проведенном исследовании нами установлено, что энзимный гидролиз (с применением фермента β-глюкуронидазы) как предварительный этап подготовки проб мочи при исследовании метадона повышает эффективность экстракции лишь на 7%, что подтверждает имеющиеся в литературе данные о выведении из организма метадона преимущественно в виде неконъюгированных соединений [3]. Учитывая незначительное улучшение степени экстракции после выполнения энзимного гидролиза, а также некоторые его особенности: необходимость строгого соблюдения условий проведения (поддержание определенной температуры и pH), длительное инкубирование, а также дороговизну реактива, целесообразность проведения ферментативного гидролиза при исследовании метадона отсутствует.

Как было отмечено, метадон обладает высокой степенью связывания с белками плазмы, что затрудняет его выделение из крови. Значительно повышает эффективность лабораторного исследования плазмы или сыворотки крови использование ацетонитрила либо других детергентов, позволяющих разрушить связи метадона с бел-

ками. Такой вариант подготовки проб позволяет одновременно исследовать и свободную, и связанную (общую) фракцию метадона.

Для разделения метадона и ЭДДП в тонком слое сорбента применялись комбинированные подвижные фазы, чаще всего используемые при хроматографическом скрининге веществ: этилацетат – этанол – раствор аммиака 25% (17:2:1), хлороформ – ацетон (9:1) и хлороформ – ацетон – раствор аммиака 25% (12:24:1). Нами установлено, что в данных системах эффективное разделение искомых веществ не достигается. В ходе проведенного исследования экспериментальным путем выяснено, что для анализа метадона и ЭДДП наиболее оптимальными являются следующие системы органических растворителей: хлороформ – метанол (9:1), метанол – аммиак (100:1,5) и гексан – диэтиловый эфир – триэтиламин (10:20:1) [13] (показатели хроматографического разделения исследуемых веществ представлены в табл. 1).

После хроматографического разделения и обработки пластин реагентами идентификация метадона и ЭДДП производилась по соответствию длины пробега анализируемых веществ (R_f) в сравнении с таковой стандартных веществ (табл. 1), а также по выявлению специфической окраски (табл. 2). В настоящем исследовании для идентификации метадона применялась реакция дегидратации, заключающаяся в нанесении на поверхность хроматографических пластин кислотосодержащих реактивов Либермана [14] или Манделина [11,15].

При оценке предела обнаружения веществ установлено, что более высокой аналитической чувствительностью – 0,1 мкг метадона в пробе (1×10^{-7}) обладает реактив Манделина. Необходимо отметить, что в биологических жидкостях анализируемые токсиканты, как правило, содержатся в небольших количествах, в связи с этим применение реактива Либермана, вследствие более низкой чувствительности реакции – 10 мкг вещества в пробе (1×10^{-5}), может быть рекомендовано для экспертного исследования объектов небиологического происхождения (порошки, растворы и др.).

В ходе исследования разработан способ идентификации основного метаболита метадона ЭДДП с использованием реакции комплексообразования путем напыления на пластину 1%-ного водного раствора соли прочного черного К с последующей обработкой 1 моль/л раствором гидроксида натрия. Аналитическая чувствительность предлагаемой реакции составила 0,1 мкг ЭДДП в пробе (1×10^{-7}), что позволяет с высокой степенью достоверности идентифицировать основной метаболит метадона.

ВЫВОДЫ

В ходе проведенного исследования установлено, что для выделения метадона из биологических жидкостей способом ЖЖЭ наиболее оптимальными экстрагентами являются смеси ор-

ганических растворителей: хлористый метилен – гептан – изопропиловый спирт (7:2:1) и хлороформ – изопропиловый спирт (9:1). При этом эффект высаливания повышает эффективность экстракции незначительно.

Введение энзимного гидролиза в качестве предварительного этапа подготовки проб для идентификации метадона нецелесообразно, т.к. эффективность экстракции при этом повышается лишь на 7%, что связано с выведением метадона из организма преимущественно в виде неконъюгированных соединений.

Эффективность лабораторного исследования образцов крови значительно повышает использование ацетонитрила или других детергентов, позволяющих разрушить связь метадона с белками плазмы.

Наиболее эффективное хроматографическое разделение метадона и ЭДДП достигается в системах органических растворителей: хлороформ – метанол (9:1), метанол – аммиак (100:1,5) и гексан – диэтиловый эфир – триэтиламин (10:20:1).

Для лабораторной диагностики злоупотреблений метадоном с использованием метода хроматографии в тонком слое сорбента при обработке хроматографических пластин целесообразно параллельное применение реактива Манделина и 1%-ного водного раствора соли прочного черного К, что позволяет идентифицировать не только нативное вещество, но и основной метаболит ЭДДП и значительно повысить эффективность диагностики анализируемых веществ в биологических пробах.

Таким образом, нами разработана методика идентификации метадона и его основного метаболита в биологических жидкостях организма человека методом хроматографии в тонком слое сорбента с применением эффективных способов подготовки проб к исследованию.

Литература:

1. Катцунг Б.Г. Базисная и клиническая фармакология: в 2 т. / Пер. с англ. / Б.Г. Катцунг. – М. – СПб.: Бинوم – Невский Диалект, 1998. – Т. 1. – 608 с.
2. Отравления наркотическими средствами, действующими на опиоидные рецепторы. Клиническая и лабораторная диагностика: учеб.-метод. пособие / В.С. Камышников [и др.]; под ред. В.С. Камышниковой. – Минск: «Адукацыя і выхаванне», 2010. – 72 с.
3. Веселовская Н.В. Наркотики. Свойства, действие, фармакокинетика, метаболизм: учеб. пособие / Н.В. Веселовская [и др.] – М.: Нарконет, 2008. – Гл. 1. – С. 50–57.
4. Элленхорн М.Дж. Медицинская токсикология: диагностика и лечение отравлений у человека: в 2 т. / Пер. с англ. / М.Дж. Элленхорн. – М.: Медицина, 2003. – Т. 1. – 1048 с.
5. Еар С.В. Interindividual variability of the clinical pharmacokinetics of methadone: implications for

- the treatment of opioid dependence / C.D. Ear, T. Buclin, P. Baumann // Clin. Pharmacokinet. – 2002. – Vol. 41. – № 14. – P. 1153-93.
6. **Изотов** Б.Н. Методы химико-токсикологической диагностики в мониторинге наркологической ситуации в России / Б.Н. Изотов [и др.] // Наркология. – 2007. - № 8. – С. 33–36.
 7. **Токсикологическая** химия. Метаболизм и анализ токсикантов: учеб. пособие для ВУЗов /Е.Ю. Афанасьева [и др.]; под. ред. Н.И. Калетиной. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 1016 с.
 8. **Шилейко** И.Д. Идентификация и количественное определение опиатов методами иммунохроматографии и хроматографии в тонком слое сорбента /И.Д. Шилейко, В.С. Камышников, А.М. Чубуков, О.М. Вергун // ARS MEDICA. – 2010. – № 4. – С. 134-139.
 9. **Руденко** Б.А. Химико-аналитическое определение наркотических и допинговых средств: учеб. пособие /Б.А. Руденко [и др.] – М.: Нарконет, 2007. – 368 с.
 10. **Шрайнер** Р. Идентификация органических соединений / Р. Шрайнер [и др.] – М.: Мир, 1983. – 704 с.
 11. **Крамаренко** В.Ф. Химико-токсикологический анализ /В.Ф. Крамаренко. – Киев: Вища школа, 1982. – 272 с.
 12. **Куценко** С.А. Основы токсикологии /С.А. Куценко. – СПб.: Фолиант, 2004. – 720 с.
 13. **Симонов** Е.А. Наркотики. Методы анализа на коже в ее придатках и выделениях /Е.А. Симонов [и др.] – М.: Анахарсис, 2000. – 130 с.
 14. **Rapid testing methods of drugs of abuse: manual for use by national law enforcement and narcotics laboratory personnel.** New York: UNITED NATIONS, 1994.
 15. **Сорокин** В.И. Использование экспресс-тестов при исследовании наркотических средств и сильнодействующих веществ: метод. рекомендации /В.И. Сорокин [и др.] – М.: ЭКЦ МВД России, 1997. – 128 с.

ВИКОРИСТАННЯ ХРОМАТОГРАФІЇ В ТОНКОМУ ШАРІ СОРБЕНТА ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ МЕТАДОНУ І ЙОГО ОСНОВНОГО МЕТАБОЛІТУ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ

І.Д. Шилейко¹, А.М. Чубуков²

Резюме. Описані в статті дослідження відносяться до хіміко-токсикологічного аналізу. В ході дослідження розроблені ефективні способи ізолювання метадону і продуктів його метаболізму із біологічних рідин методом рідина-рідинної екстракції, а також ідентифікації метадону і його

основного метаболіта з використанням метода хроматографії в тонкому шарі сорбента. В результаті розроблена технологія діагностики метадону в організмі людини.

Ключеві слова. Судово-медична токсикологія, метадон.

THE USE OF THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY TO DETECT METHADONE AND ITS MAJOR METABOLITE IN BIOLOGICAL FLUIDS

I. Shyleika¹, A. Chubukou²

Summary. Research described in this article relate to the field of chemical-toxicological analysis. In the study, there are effective ways to isolate methadone and its metabolic products from biological fluids using liquid-liquid extraction, and the identification of methadone

and its major metabolite using the method of Thin-Layer Chromatography. The result is a working out of technology of methadone laboratory diagnostics in the human organism.

Key words: forensic toxicology, metadon.