

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОБНАРУЖЕНИЯ КАННАБИНОИДОВ В ОБРАЗЦАХ БИОМАТЕРИАЛА ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМИ ОТРАВЛЕНИЯМИ

Вергун О. М.¹, Боровикова Л. Н.², Яранцева Н. Д.¹

¹Учреждение образование «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь;

²Учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. За последнее десятилетие отмечается тенденция к увеличению общего числа острых отравлений наркотиками, особенно курительными смесями растительного или синтетического происхождения, и другими психоактивными веществами. Пик потребления и по данным правоохранительных органов и количеству острых отравлений в Республике Беларусь, как и других европейских государствах, приходился на 2013–2014 гг. [3]. Наркомания из проблемы сугубо медицинской превратилась в проблему социальную и юридическую, постепенно приобретая, по оценкам аналитиков, статус главной угрозы для безопасности стран [2]. Исходя из этого, актуальным становится вопрос о достоверной экспертизе наличия запрещенных веществ в организме, разработке надежных и эффективных методик выделения метаболитов каннабиноидов из биологического материала с дальнейшей идентификацией хроматографическими методами.

Ключевые слова: каннабиноиды, жидкость-жидкостная экстракция, твердофазная экстракция, дериватизация, тонкослойная хроматография, газовая хроматография, масс-спектрометрия.

Введение. Каннабис имеет долгую историю использования в медицинских и оздоровительных целях. Первые доказательства применения конопли в качестве лекарства были найдены археологами, которые обнаружили следы марихуаны в останках молодой женщины, умершей, вероятно, при рождении ребенка 1600 лет назад. Каннабис некогда широко использовался для лечения целого ряда заболеваний: невралгии, подагры, ревматизма, бешенства, холеры, малярии и пр.[2].

В настоящее время каннабис является одним из наиболее распространенных наркотиков во всем мире. Согласно данным, представленным во Всемирном докладе о наркотиках (2017 г.), по оценкам управления ООН по наркотикам и преступности, в 2015 г. численность потребителей каннабиса составляла 183 млн человек, т. е. примерно 3,8 % населения мира.

Каннабиноиды — это вещества, содержащиеся в различных частях растения конопли (*Cannabis sativa*). Наркотические средства, изготовленные из растительного сырья, представлены в виде марихуаны (высушенных верхних частей растения с цветками и листьями), смолы каннабиса (гашиша) и гашишного масла, получаемого путем экстракции. Согласно Списку 5 «Республиканского перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих государственному контролю в Республике Беларусь» марихуана, гашиш и гашишное масло отнесены к опасным наркотическим средствам, не используемым в медицинских целях, оборот которых запрещен на территории нашей страны.

В состав растительных каннабиноидов входят более 400 соединений, биологически активными веществами являются более 70 соединений. Основным компонентом, отвечающим за психоактивные свойства марихуаны, является транс- Δ^9 -тетрагидроканнабинол (ТГК). Веществами, обнаружение которых в биологическом материале человека свидетельствует об употреблении марихуаны, являются: транс- Δ^9 -тетрагидроканнабинол (ТГК) и его основные метаболиты: 11-гидрокси- Δ^9 -тетрагидроканнабинол (11-ОН-ТГК) и 11-нор-9-карбокси- Δ^9 -тетрагидроканнабинол (ТГК-СООН), в меньших количествах — каннабинол (КБН) и каннабидиол (КБД).

При курении каннабиноиды быстро, в течение нескольких минут, всасываются в кровь. Уровень ТГК в крови быстро нарастает, достигая максимальной концентрации через 5–30 мин, период полувыведения зависит от индивидуальных особенностей организма и составляет около 20 ч. Интервал концентрации ТГК в крови лиц, употребляющих марихуану, равен от 0–113 нг/мл. После поступления в организм ТГК распределяется в тканях, богатых липидами — жировых отложениях, мозге, легких, печени, почках, половых органах, клеточных мембранах; объем распределения в среднем составляет 10 л/кг. В организме человека метаболизм каннабиноидов осуществляется преимущественно в печени. При хроническом употреблении марихуаны ТГК накапливается в жировой ткани, обнаружение данного соединения возможно даже через 1 мес. и более после сеанса курения, содержание ТГК в жировых отложениях намного (в 6–300 раз) превышает содержание в крови, моче и других тканях организма. Накопленный ТГК постепенно возвращается в систему кровообращения и определяется с использованием высокочувствительных методов в крови в течение нескольких часов, в моче спустя 7–10 дней однократного употребления [1].

В клинической практике для обнаружения каннабиноидов в организме пациентов чаще всего исследуют образцы мочи с помощью иммунохимических и хроматографических методов анализа (тонкослойной хроматографии, газовой хроматографии с масс-спектрометрией, высокоэффективной жидкостной хроматографии), используя различные варианты пробоподготовки.

Цель работы — сравнительная оценка методик выделения каннабиноидов из образцов биологического материала, подбор оптимальных условий их идентификации хроматографическими методами.

Материалы и методы. Материалом исследования являлись пробы мочи пациентов, поступивших в Республиканский токсикологический центр по лечению острых отравлений химической этиологии, у которых иммунохимический тест на каннабиноиды был положительный.

Подготовка проб к исследованию проводилась в два этапа. Поскольку метаболиты ТГК в моче находятся в виде глюкуронидов, на 1-м этапе осуществляли гидролиз парных соединений (щелочной либо ферментативный), после чего выполняли изолирование каннабиноидов с помощью жидкость-жидкостной (далее — ЖЖЭ) или твердофазной экстракции (далее — ТФЭ). Полученные экстракты исследовали методами тонкослойной хроматографии (далее — ТСХ) и газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (далее — ГХ/МС).

Щелочной гидролиз. 5 мл исследуемой мочи, 1 мл метилового спирта и 0,5 мл насыщенного раствора гидроксида натрия помещали во флакон с завинчивающейся крышкой, инкубировали образец на водяной бане при температуре 60 °С в течение 10 мин, затем охлаждали до комнатной температуры.

Жидкость-жидкостная экстракция. Полученный гидролизат подкисляли концентрированной хлористоводородной кислотой до pH = 2,0 по универсальному индикатору, добавляли 5 мл смеси н-гексан — этилацетат (7:1), экстрагировали в течение 5 мин, центрифугировали смесь при 2500 об./мин (3 мин), после чего отделяли органический слой и упаривали его досуха в токе теплого воздуха. Сухой остаток растворяли в 200 мкл хлороформа, затем исследовали методами ТСХ и ГХ/МС [5].

Для изолирования нейтральных, слабоосновных компонентов экстракцию из гидролизованной мочи осуществляли при pH = 12–13, в органической фазе при этом обнаруживаются ТГК, каннабинол и ОН-метаболиты. Наиболее простая очистка в ходе ЖЖЭ включает экстракцию органическим растворителем, реэкстракцию в водно-щелочной слой, подкисление и последующую реэкстракцию органическим растворителем.

Ферментативный гидролиз осуществляется с использованием β -глюкуронидазы (*Escherichiacoli*): 3,0 мл мочи помещали во флакон, добавляли 1,0 мл 1/15 М фосфатного буфера pH = 6,8 и 30 мкл раствора β -глюкуронидазы, инкубировали в течение 120 мин при температуре 45 °С.

Твердофазная экстракция (ТФЭ). По окончании инкубации образца мочи с ферментом пробу охлаждали до комнатной температуры, добавляли 2 мл 1/15 М фосфатного буфера pH = 4,8, центрифугировали со скоростью 2500 об/мин (10 мин), после чего отделяли пробу от осадка.

Кондиционирование (активацию) сорбента проводили путем последовательного пропускания через колонку для ТФЭ (EVIDEX — Vox) 2 мл 96 % этанола, затем 2 мл воды очищенной под вакуумом, обеспечивающим скорость потока жидкости около 2 мл/мин. Образец биологической жидкости после ферментативного гидролиза пропускали через колонку при вакууме со скоростью 1,5–2 мл/мин, после чего промывали колонку 1 мл фосфатного буфера pH = 4,8 и 1 мл 10 % этилового спирта (со скоростью 2 мл/мин). После промывки патрон сушили под вакуумом в течение 20 мин. Элюирование осуществляли следующим образом: через колонку двукратно со скоростью 1,5–2 мл/мин пропускали по 2 мл смесей растворителей н-гексан – этилацетат (в соотношении 2:1) для изолирования веществ кислого характера и дихлорметан – изопропанол — 25 % раствор аммиака (2:1:0,1) для веществ основного характера. Органические извлечения объединяли, упаривали досуха в токе теплого воздуха, сухой остаток растворяли в 200 мкл хлороформа и исследовали методами ТСХ и ГХ/МС.

Дериватизация. Для выявления основного метаболита каннабиноидов — 11-нор-дельта-9-карбокситетрагидроканнабиноловой кислоты (ТГК-СООН) — перед исследованием методом хромато-масс-спектрометрии образец, полученный разными экстракционными методами, подвергали дериватизации (химически изменяя структуру вещества) путем метилирования.

К сухому остатку в фарфоровом тигле добавляли 180 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и 40 мкл 25 %-го раствора тетраметиламмония гидроксида в метаноле (ТМА), перемешивали и инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре, после чего добавляли 40 мкл йодметана, выдерживали 20 мин (при комнатной температуре). Затем смесь переносили во флакон с завинчивающейся крышкой и экстрагировали 4 мл н-гексана в течение 10 мин, центрифугировали образец, отбирали верхний органический слой и упаривали его досуха в токе теплого воздуха. Полученный сухой остаток реконструировали в 200 мкл хлороформа и исследовали методом ГХ/МС.

Тонкослойная хроматография: на пластину для тонкослойной хроматографии (MerkSilicagel-60), предварительно активированную при 80 °С (30 мин), наносили в качестве стандарта раствор ТГК-СООН с концентрацией 1 мг/л и образец пробы мочи, полученный разными экстракционными методами, послещелочного или ферментативного гидролиза. Пластины хроматографировали в системе растворителей: н-гексан-изобутанол-ледяная уксусная кислота (в соотношении 9:0,9:0,1), после чего высушивали на воздухе. Проявляли 0,1 % раствором прочного синего Б в 70 % этиловом спирте, подсушивали, затем обрабатывали 10 % раствором гидроксида натрия. Идентификацию ТГК-СООН проводили по наличию пятна красно-фиолетового цвета в зоне исследуемого образца, а также по соответствию длины пробега (Rf) по сравнению со стандартом.

Газожидкостная хроматография с масс-спектрометрией. Пробы, полученные разными экстракционными методами, исследовали на газовом хроматографе Agilent 6890N, оснащенный масс-селективным детектором Agilent 5975С.

Условия разделения: колонка капиллярная DB-5MS (30,0 м – 0,250 мм – 0,25 мкм), скорость потока газа-носителя (гелия) 1,2 мл/мин, объем вводимой пробы 2 мкл, режим ввода — с делением потока 10:1, температура инжектора 250 °С. Программа колонки: начальная температура 150 °С — 5 мин, затем увеличивается до 200 °С со скоростью 15 °С/мин, далее — до 290 °С со скоростью 8 °С/мин, далее — до 300 °С со скоростью 4 °С/мин, после чего поддерживается постоянной в течение 5 мин. Общее время анализа — 27,08 мин. Температура интерфейса, квадруполя и масс-детектора составляет 280; 150 и 230 °С соответственно. Режим сканирования — полный ионный ток с диапазоном масс 30–800 m/z, данные приведены в таблице. Идентификацию обнаруженных соединений осуществляли с помощью электронных библиотек масс-спектров PMWTox 3, NIST 11.

Таблица — Масс-спектры ТГК и его основных метаболитов

Соединение	m/z
ТГК	299, 271, 231, 314
Каннабинол	295, 238, 310
11-ОН-ТГК	299, 330
ТГК-СООН (метилловый эфир)	313, 357, 372

Результаты и их обсуждение. В современной практике химико-токсикологического анализа существует достаточно широкий спектр методов идентификации каннабиноидов в образцах биоматериала, а также способов подготовки проб к исследованию. Выбор метода подготовки проб для анализа зависит, главным образом, от технического оснащения лаборатории и от задач, поставленных перед исследователем: либо диагностика острого отравления (передозировки), либо экспертиза с целью подтверждения факта употребления психоактивного вещества, либо анализ чистых веществ. Поэтому особенностью химико-токсикологического исследования на наличие каннабиноидов при острых отравлениях является необходимость проведения на этапе пробоподготовки гидролиза парных соединений — тетрагидроканнабинола и его метаболитов с глюкуроновой кислотой. Неоспоримым преимуществом щелочного гидролиза для анализа образцов биоматериала пациентов с острыми отравлениями является быстрота проведения процедуры. Сложноэфирная связь ТГК-СООН глюкуронида хорошо подвергается щелочному гидролизу, в то время как простые эфирные связи ТГК и гидроксильных метаболитов с глюкуроновой кислотой не разрушаются в щелочных условиях, и для обнаружения этих соединений необходим ферментативный гидролиз, являющийся более сложным, затратным и длительным способом пробоподготовки.

Наиболее доступным способом извлечения каннабиноидов из образцов после гидролиза является жидкость-жидкостная экстракция, однако при этом возможно загрязнение экстрактов эндогенными соединениями, а также попадание водной фазы в органический экстрагент, поэтому необходимо тщательно разделить водный и органический слой в ходе ЖЖЭ, что является особенно важным при необходимости исследования образцов методом ГХ/МС. Для очистки проб от сопутствующих кислот и липидов применяют твердофазную экстракцию. Кроме того, согласно данным литературы, применение ТФЭ после стадии ферментативного гидролиза позволяет добиться выхода каннабиноидов до 90–98 % [4].

Идентификация метаболитов тетрагидроканнабинола с помощью тонкослойной хроматографии не требует специального оборудования, однако необходимо иметь стандарты определяемых веществ для сравнения окраски пятен на хроматографических пластинах и Rf. ТСХ широко применяется в анализе образцов мочи пациентов на наличие каннабиноидов, а также при исследовании смывов с рук, губ при освидетельствовании для подтверждения факта употребления марихуаны.

Более высокоспецифичным и чувствительным методом определения каннабиноидов является газожидкостная хроматография с масс-селективным детектированием, позволяющая обнаруживать как нативные соединения после экстракции гидролизованных образцов мочи пациентов с острыми отравлениями (передозировками), так и дериватизированные производные в биопробах после однократного употребления каннабиса. Однако количественная оценка обнаружения каннабиноидов в биоматериале не проводилась из-за отсутствия стандартных веществ метаболитов каннабиноидов.

Заключение. В химико-токсикологическом анализе наибольшие трудности возникают при исследовании образцов биологических жидкостей организма человека, представляющих собой многокомпонентные системы, содержащие большое количество примесных и балластных веществ.

Проблемы, возникающие при исследовании таких объектов, обусловлены как необходимостью разделения многокомпонентных систем, их очистки от балластных веществ и примесей традиционными методами (например, ЖЖЭ), так и сложностью концентрирования определяемых соединений, нередко содержащихся в пробах в очень небольших количествах. Это приводит к ограничению возможностей применения тонкослойной хроматографии, затрудняя идентификацию психоактивных веществ (в т. ч. каннабиноидов).

Как показывает сравнительная оценка методик пробоподготовки: выделения каннабиноидов из образцов биологического материала, решение вышеуказанных проблем возможно при применении на стадии пробоподготовки метода твердофазной экстракции, позволяющего осуществлять безэмульсионное извлечение с высокой пропускной способностью и концентрирование целевых компонентов с последующей дериватизацией образцов для улучшения хроматографических свойств определяемых веществ. Такой подход позволяет проводить идентификацию каннабиноидов и других психоактивных веществ методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, не требующим наличия образцов сравнения.

Литература

1. Современные методы анализа каннабиноидов и их метаболитов в биосредах / А. Е. Коваленко [и др.]. — М., 2000.
2. Соломзес, Дж. А. Наркотики и общество / Дж. А. Соломзес, В. Чебурсон, Г. Соколовский. — М.: Изд-во «ОСР Палек», 1998.
3. Вергун, О. М. Профилактика злоупотребления психотропными, наркотическими средствами / О. М. Вергун, Н. Д. Яранцева // Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами: материалы III Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием (24–26 мая 2017 г.). — Пермь, ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, 2017. — С. 147–152.
4. Сычев, К. С. Материалы и методы пробоподготовки в хроматографии: твердофазное концентрирование и адсорбционная очистка / К. С. Сычев, В. А. Даванков // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2009. — № 2. — С. 49–54.

5. Темердашев, А. З. Скрининг и определение некоторых наркотических и психоактивных веществ в материалах природного и синтетического происхождения хроматографическими методами : автореф. дис. ... канд. хим. наук / А. З. Темердашев. — Краснодар, 2015. — 23 с.

ACUTE POISONING BY CANNABINOIDS, METHODS OF EXTRACTION FROM BIOLOGICAL OBJECTS, METHODS OF DETECTION

Viarhun O. M.¹, Borovikova L. N.¹, Yarantseva N. D.²

¹Educational Establishment “The Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus;

²Institution of Health “City Clinical Hospital of Emergency Medical Care”, Minsk, Republic of Belarus

Over the past decade there has been a trend towards an increase in the total number of acute drug poisoning and, in particular, smoking mixtures of plant or synthetic origin and other psychoactive substances. Consumption peak and according to law enforcement bodies and the number of acute poisonings in the Republic of Belarus, as well as other European countries, accounted for 2013–2014 [3]. Drug addiction from the problem of purely medical has turned into a social and legal problem, gradually acquiring, according to analysts, the status of the main threat to the security of countries [2]. Proceeding from this, the issue of reliable examination of the presence of forbidden substances in the body, the development of reliable and effective methods for isolating the metabolites of cannabinoids from biological material with further identification by modern chromatographic methods become topical.

Keywords: cannabinoids, liquid-liquid and solid-phase extraction, derivatization, thin-layer chromatography, gas chromatography with mass-selective detection.

Поступила 04.07.2018