

ОБНАРУЖЕНИЕ ТРАМАДОЛА И ЕГО ОСНОВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В МОЧЕ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

The article deals with some aspects of a chemo-toxicological analysis of tramadol that is commonly used as analgesic. The authors propose a method for tramadol identification in urine. Presented technique based on tramadol detection by thin-layer chromatography. As a result of the study an optimal way of extraction, the composition of mobile phase and reagents for tramadol identification were chosen.

Трамадол (транс-2-[(диметиламино)метил]-1-(3-метоксифенил)-циклогексан-1-ола гидрохлорид) – синтетический опиоидный анальгетик центрального действия, представляющий собой рацемическую смесь двух изомеров, участвующих в обезболивании. По своему анальгетическому потенциалу трамадол близок к кодеину и принадлежит к анальгетикам средней силы. Его биотрансформация осуществляется в печени, при этом образуются несколько метаболитов, из которых только один – *o*-МТБ (фенольный метаболит, *o*-дезметилтрамадол) – селективно стимулирует мю-опиоидные рецепторы и, таким образом, обладает фармакологической активностью [1]. В аналитической практике значение имеют два основных метаболита трамадола – *o*-МТБ и N-МТБ (вторичный амин, N-дезметилтрамадол),

остальные продукты биотрансформации образуются в меньшем количестве, и их обнаружение зависит от дозы принятого препарата и стадии метаболизма.

Трамадол применяется в клинической практике уже более 20 лет. Он широко используется для купирования острого болевого синдрома в хирургической практике, назначается онкологическим больным; имеются данные о его применении в ревматологии и неврологии [2]. Однако, несмотря на низкий наркотический потенциал, при длительном применении трамадол способен вызывать привыкание, зависимость и синдром отмены [3].

В последние годы наблюдается стойкая тенденция к увеличению числа случаев немедицинского потребления трамадола. По данным Городского наркологического диспансера (г. Минск), количество выявленных фактов употребления трамадола с немедицинской целью составило: в 2007 г. – 186, в 2008 г. – 233, в 2009 г. – 419 случаев. В 2009 г. трамадол был внесен в Республиканский перечень наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих государственному контролю в Республике Беларусь.

В настоящее время особенно актуальным является вопрос создания и утверждения официальных методик обнаружения наркотических средств и психотропных веществ в биологических жидкостях, что имеет большое значение для осуществления профилактики злоупотребления наркотиками.

Целью настоящей работы явилась разработка методики обнаружения трамадола и его метаболитов в моче.

Экспериментальная часть

Материал и методы исследования. Материалом исследования служила моча лиц, доставленных для освидетельствования в кабинет экспертизы опьянения Городского клинического наркологического диспансера с подозрением в употреблении наркотических или психотропных веществ, у которых при скрининге методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) был выявлен трамадол, что в дальнейшем было подтверждено газохроматографическим методом с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ/МС). Для приготовления стандартных растворов трамадола использовали трамадол-основание (не менее 99 % чистоты).

Методы извлечения. Эффективность экстракции изучалась с использованием интактных проб мочи, в которых растворяли навески трамадола-основания. После инкубирования в течение 24 ч при температуре +4 °С пробы исследовали. Для выявления максимально эффективного метода изолирования трамадола из мочи были апробированы четыре следующих экстрагента: I – хлороформ; II – смесь растворителей хлороформ – *n*-бутанол (9:1); III – смесь растворителей хлороформ – изопропиловый спирт (9:1); IV – смесь растворителей диэтиловый эфир – этилацетат (1:1). Хлороформ (I) широко применяется в качестве экстрагента при скрининговом исследовании на наличие наркотических и психоактивных веществ; экстрагент II был выбран нами как возможно эффективный. В литературе описаны методы извлечения трамадола с использованием экстрагентов III и IV [4–7].

В настоящем исследовании экстрагирование выполнялось при pH 11–12, поскольку трамадол и его важнейшие метаболиты являются веществами основного характера, имеющими константу ионизации (pK_a) от 9,0 до 10,0, для обеспечения полноты экстракции которых необходимо подщелачивание пробы до pH не менее 11,0. Количественное определение трамадола проводилось методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием на газовом хроматографе Agilent 6890 с масс-селективным детектором Agilent 5975B производства США с применением библиотек масс-спектров электронного удара PMW Tox3, Wiley 7, NIST 05 и NIST Search. Расчет производился по градуировочному графику, построенному с использованием стандартных растворов трамадола.

Методы идентификации. Обнаружение трамадола и его основных метаболитов в моче проводилось нами одним из наиболее доступных методов химико-токсикологического анализа – методом тонкослойной хроматографии.

Для исследования были использованы пластины «Sorbfil» ПТСХ-II-B (РФ) с зернением силикагеля 8–12 мкм. Экстракты наносили на хроматографическую пластину параллельно со «свидетелем» (стандартным раствором трамадола), после чего проводили хроматографирование. Для разделения трамадола и его метаболитов были использованы следующие системы:

- I – этилацетат – этанол – аммиак (17:2:1);
- II – бензол – этанол – триэтиламин (9:1:1);
- III – этилацетат – гексан – аммиак (50:15:2);
- IV – хлороформ – этилацетат – аммиак (12:8:0,2);
- V – ацетон – аммиак – хлороформ (16:0,7:8).

После завершения процесса хроматографического разделения пластинки высушивали и обрабатывали растворами реагентов. Количественной величиной, отражающей подвижность вещества, являлось значение R_f .

Для идентификации трамадола нами были изучены свойства следующих реагентов, используемых для определения наркотических и психоактивных веществ: реактив Марки (1 капля формалина в 1,0 мл концентрированной серной кислоты, х. ч.); 1 % (10 г/л) раствор нингидрина в концентрированной серной кислоте; реактив Манделина (0,01 г ванадата аммония, растворенного в 2,0 мл концентрированной серной кислоты); реактив Эрдмана (смесь концентрированных серной и азотной кислоты в соотношении 1:1); реактив Либермана (1,0 г нитрита натрия в 10,0 мл концентрированной серной кислоты); реактив Фреде (насыщенный раствор молибдата аммония в концентрированной серной кислоте); 1 % водный раствор красителя прочного черного.

Результаты и их обсуждение

Показатели эффективности извлечения трамадола из мочи отражены в табл. 1.

Таблица 1

Эффективность извлечения трамадола из мочи

Экстрагент	Степень экстракции, $\bar{x} \pm Sx$, %*
Хлороформ	60,16±0,48
Хлороформ – <i>n</i> -бутанол (9:1)	80,06±0,65
Хлороформ – изопропиловый спирт (9:1)	84,73±0,60
Диэтиловый эфир – этилацетат (1:1)	40,20±0,52

Примечание. *Приведенное значение процента экстракции представляет собой среднее значение, полученное при выполнении 30 параллельных исследований.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что наиболее эффективным при направленном исследовании на трамадол является использование для экстракции смесей растворителей хлороформ – *n*-бутанол (9:1) или хлороформ – изопропиловый спирт (9:1). Применение этих реагентов позволяет выделить до 85 % трамадола, присутствующего в образце мочи, в то время как с помощью традиционно применяемой экстракции хлороформом удастся извлечь не более 60 % анализируемого вещества.

Анализ данных, приведенных в табл. 2, показывает, что наиболее эффективное разделение трамадола и его основных метаболитов методом тонкослойной хроматографии достигается при использовании двух систем: бензол – этанол – триэтиламин и этилацетат – гексан – аммиак. Их применение позволяет получить четкую картину хроматографического разделения: трамадол, *o*-дезметилтрамадол и *N*-дезметилтрамадол располагаются на пластинке отдельными зонами.

Таблица 2

Обнаружение трамадола и его метаболитов при исследовании методом ТСХ

Система растворителей	R_f		
	трамадола	<i>o</i> -МТБ	<i>N</i> -МТБ
Этилацетат – этанол – аммиак 17:2:1	0,83	0,76	0,83
Бензол – этанол – триэтиламин 9:1:1	0,80	0,62	0,71
Этилацетат – гексан – аммиак 50:15:2	0,64	0,30	0,38
Хлороформ – этилацетат – аммиак 12:8:0,2	0,71	0,47	0,71
Ацетон – аммиак – хлороформ 16:0,7:8	0,82	0,72	0,82

Наиболее специфичная и интенсивная окраска продуктов взаимодействия изученных реагентов с трамадолом возникает после обработки хроматографической пластинки реактивом Марки, 1 % раствором нингидрина в серной кислоте и реактивом Манделина. Для данных реагентов были определены значения предела обнаружения трамадола, представленные в табл. 3.

Идентификация трамадола и его метаболитов при исследовании методом ТСХ

Реактив	Окраска	Предел обнаружения, мкг в пробе
Реактив Марки	Оранжево-коричневая, переходящая в зеленую; при добавлении нескольких капель воды – изумрудно-зеленая	1,0
1 % раствор нингидрина в серной кислоте	Розово-малиновая; при добавлении нескольких капель воды – оранжевая	1,0
Реактив Манделина	Серо-зеленая	3,0
Реактив Эрдмана	Светло-желтая	–
Реактив Либермана	Светло-желтая	–
Реактив Фреде	Серо-зеленая	–
1 % раствор прочного черного	Бледно-розовая, выцветающая в центре	–

В итоге проведенного исследования разработана методика качественного определения трамадола и его метаболитов в моче методом тонкослойной хроматографии на основе применения предложенных эффективных способов экстрагирования, систем фракционирования и реагентов для идентификации определяемого вещества.

Предлагаемая методика хроматографического исследования трамадола проста в применении, не требует дорогостоящего оборудования и может быть использована для обнаружения трамадола в моче во всех токсикологических лабораториях системы Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

1. Веселовская Н.В., Коваленко А.Е. Наркотики. Действие. Свойства. Метаболизм. М., 2000. С. 218.
2. Кириенко П.А. // Рус. мед. журн. 2004. Т. 12. № 8. С. 512.
3. Муравьев Ю.В., Евсикова М.М. // Клин. фармакология и терапия. 2005. № 14. С. 83.
4. Веселовская Н.В., Кислун Ю.В., Еремин С.К. и др. // Суд.-мед. экспертиза. 1996. № 7. С. 39.
5. Мелентьев А.Б., Ким Д.Г. // Изв. Челябин. науч. центра. 2003. № 1 (18.). С. 98.
6. Волков А.А., Мишихин В.А. // Микроэлементы в медицине. 2005. № 6. С. 102.
7. Залесова В.А., Катаев С.С., Курдина Л.И. // Вопр. наркологии. 1998. № 2. С. 53.
8. Токсикологическая химия / Под ред. Т.В. Плетеневой. М., 2005. С. 187.

Поступила в редакцию 14.09.10.

Лидия Николаевна Боровикова – аспирант кафедры клинической лабораторной диагностики Белорусской медицинской академии последипломного образования. Научный руководитель – В.С. Камышников.

Владимир Семенович Камышников – доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики Белорусской медицинской академии последипломного образования.

Александр Михайлович Чубуков – заведующий токсикологической лабораторией Городского наркологического диспансера.